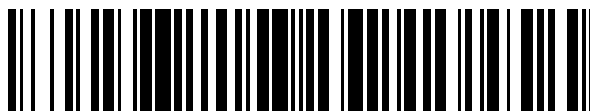


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 860 423**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071**

(2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2015** **PCT/US2015/032626**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2015** **WO15183920**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2015** **E 15728704 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2021** **EP 3149156**

54 Título: **Métodos y sistemas para convertir células precursoras en tejidos gástricos mediante diferenciación dirigida**

30 Prioridad:

**28.05.2014 US 201462003719 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.10.2021**

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL MEDICAL CENTER  
(100.0%)  
3333 Burnet Avenue  
Cincinnati, OH 45229-3039, US**

72 Inventor/es:

**WELLS, JAMES, MACORMACK y  
MCCRACKEN, KYLE, WILLIAM**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 860 423 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos y sistemas para convertir células precursoras en tejidos gástricos mediante diferenciación dirigida

## 5 Campo de la invención

En la presente descripción se describen métodos y sistemas relacionados con la conversión de células madre en tejido(s) u órgano(s) específico(s) mediante diferenciación dirigida. En particular, se describen métodos y sistemas para promover la formación del endodermo definitivo a partir de células madre pluripotentes humanas. También se describen métodos y sistemas para promover organoides gástricos o formaciones tisulares a partir de endodermo definitivo diferenciado.

## Antecedentes

La función y la arquitectura del estómago varían ampliamente entre las especies de mamíferos, para adaptarse a una amplia variedad de hábitats y dietas. En consecuencia, los modelos no humanos de desarrollo y enfermedad gástrica tienen limitaciones significativas. Por ejemplo, la bacteria *Helicobacter Pylori* infecta al 50 % de la población mundial, donde el 10 % desarrolla la enfermedad ulcerosa péptica y el 1-2 %<sup>1-3</sup> desarrolla cáncer gástrico. Las enfermedades gástricas, incluidas la enfermedad ulcerosa péptica y el cáncer gástrico, afectan al 10 % de la población mundial y se deben en gran medida a la infección crónica por *H. pylori*. Los modelos actuales de la enfermedad inducida por *H. pylori* se basan en modelos animales que no exhiben las mismas características fisiopatológicas que la respuesta humana a la infección<sup>4</sup>, y las líneas celulares gástricas carecen de la complejidad celular y arquitectónica del epitelio gástrico *in vivo*. Por lo tanto, no existe un modelo adecuado para estudiar los efectos de la infección por *H. pylori* como ocurre en seres humanos. Si bien los avances recientes que usan células madre gástricas adultas permiten el crecimiento del epitelio gástrico de roedores *in vitro*<sup>5</sup>, la obtención de estas células de pacientes humanos requeriría cirugía. Además, tal método no podría usarse para modelar el desarrollo embrionario del estómago humano o las interacciones estromales-epiteliales. Las diferencias de especies en el desarrollo embrionario y la arquitectura del estómago adulto hacen que los modelos murinos sean subóptimos para el estudio de la organogénesis y la patogénesis de este órgano. Por tanto, existe la necesidad de sistemas *in vitro* robustos para dilucidar los mecanismos subyacentes al desarrollo y la enfermedad del estómago humano y para la identificación de nuevos tratamientos útiles para el tratamiento humano de tales enfermedades.

Lo que se necesita en la técnica son métodos y sistemas para controlar con precisión el destino de una célula precursora, tal como una célula madre pluripotente humana, con el fin de crear el tipo específico de tejido u organismo deseado, en particular, tejidos gástricos que pueden usarse para uno o más de los propósitos antes mencionados.

## Breve resumen

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

## Breve descripción de los dibujos

Los expertos en la técnica entenderán que los dibujos, descritos a continuación, son solo para fines ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

El expediente de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujo(s) en color, previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

La Figura 1 representa la expresión de Sox2/Cdx2/B-catenina en esferoides gástricos y el efecto de AR.

Las Figuras 2A-2E representan la representación esquemática del sistema de cultivo *in vitro* usado para dirigir la diferenciación de las hPSC en organoides gástricos tridimensionales (Figura 2A), los marcadores que definen el desarrollo de órganos del intestino anterior posterior mediante tinción inmunofluorescente total de embriones de ratón E10.5 con Sox2, Pdx1 y Cdx2 (Figura 2B), expresión de PDX1 en presencia y ausencia de AR (Figura 2C), estereomicrografías que muestran cambios morfológicos durante el crecimiento de esferoides del intestino anterior posterior en hGO (Figura 2D) y una comparación del antro de ratón en desarrollo en E14.5 y E18.5 y etapas comparables de desarrollo de hGO (Figura 2E).

Las Figuras 3A-3D representan la expresión de Muc5AC, TFF2, GSII UEAI y CHGA en antro de P12, antro de E18.5 y organoide de d34 (Figura 3A), una representación esquemática de los diferentes roles de EGF en el crecimiento, morfogénesis y especificación del tipo celular durante desarrollo de los hGO (Figura 3B), expresión de gastrina, grelina, 5-HT y ChrA en organoides gástricos con y sin DOX (Figura 3C), y expresión relativa de NEUROG3 a múltiples concentraciones de EGF (Figura 3D).

Las Figuras 4A-4D representan la expresión de SOX9 Ki67 en organoide de d34, antro de E18.5 y antro de P12 (Figura 4A), infección de organoides por H.Pylori visualizada con el uso de microscopía de campo claro y tinción inmunofluorescente (Figura 4B), inmunoprecipitación para el oncogén c-Met (Figura 4C) y proliferación celular en el epitelio de hGO, medida por incorporación de EdU (Figura 4D).

Las Figuras 5A-5D representan la expresión de Sox2 y Cdx2 en presencia del inhibidor de GSK3 $\beta$  CHIR99021 y WNT3A recombinante en presencia y ausencia de noggin (Figura 5A), la morfogénesis del tubo intestinal inducida por CHIR y la producción de esferoides visualizada mediante microscopía de campo claro (Figura 5B), tinción inmunofluorescente de cultivos en monocapa para evaluar la inducción de CDX2 en el endodermo tratado con CHIR/FGF y la inducción de SOX2 en el endodermo tratado con noggin y con CHIR/FGF/noggin (Figura 5C), análisis de qPCR de genes diana de BMP MSX1/2 (Figura 5D), y expresión de SOX2 y CDX2 en presencia y ausencia de BMP2

Las Figuras 6A-6G representan una tabla que compara la formación de esferoides y las características entre dos líneas hESC (H1 y H9; solo ejemplo de referencia-no forma parte de la invención) y una línea iPSC (72.3) (Figura 6A), tinción inmunofluorescente de hGO de 34 días derivadas de las líneas celulares H1 e iPSC 72.3 (Figura 6B), cuantificación del tipo de células epiteliales de órganos en los hGO de 34 días (Figura 6C), caracterización de la línea de células madre pluripotente inducida iPSC 72.3 (Figura 6D-G).

Las Figuras 7A-7D representan una ilustración esquemática de experimentos de formación de patrones del intestino anterior (Figura 7A), imágenes de campo claro que muestran que AR aumenta el número de esferoides que se producen a partir de cultivos de monocapa del intestino anterior (Figura 7B), una imagen de menor potencia de la Figura 1d que muestra una imagen inmunofluorescente de un embrión en estadio de 14 somitas con proteína Hnf1 $\beta$  localizada en la porción posterior del intestino anterior (Figura 7C), análisis de qPCR de la expresión génica en esferoides del intestino anterior tratados con AR (Figura 7D).

La Figura 8 representa imágenes de campo claro e inmunotinción en las últimas etapas de la diferenciación de hGO.

La Figura 9 representa la expresión del factor de transcripción durante el desarrollo del antro de ratón y los organoides gástricos humanos durante cuatro etapas embrionarias (E12.5, E14.5, E16.5 y E18.5) y una etapa postnatal (P12) del desarrollo del antro *in vivo*.

La Figura 10 representa la expresión de pHH3/E-Cad/DAPI y la expresión de aPCC/E-CAD/DAPI en el antro de E12.5 y hGO de 13 días.

Las Figuras 11A-11C representan la expresión del factor de transcripción del mesénquima antral BAPX1 (Figura 11A) y la tinción para marcadores de tipo de células mesenquimales (Figura 11C).

La Figura 12 representa el desarrollo de células endocrinas del antro gástrico *in vivo*.

Las Figuras 13A-13B representan la tinción para el marcador pan-endocrino CHGA (Figura 13A) y la expresión de los marcadores endocrinos CHGA, GASTRINA, GHRELINA y SOMATOSTATINA (Figura 13B).

La Figura 14 muestra un resumen de métodos para la diferenciación dirigida de organoides gástricos. Se indica cada etapa en el proceso de diferenciación, junto con estereomicrografías representativas.

La Figura 15 representa un esquema del estómago de ratón y la medición de marcadores regionales conocidos en el estómago anterior, el fondo, el antro y el duodeno.

La Figura 16 representa la medición de nuevos marcadores regionales en el estómago anterior, el fondo, el antro y el duodeno.

La Figura 17 representa el protocolo de especificación del fondo y la medición de GAPDH, Gata4, Axin2, Sox2, Pdx1 y Cdx2 en células de control y tratadas con Wnt100, Wnt500 y CHIR. El eje y representa la expresión genética relativa.

La Figura 18 representa las mediciones de Axin2, IRX2, IRX3, Pitx1 e IRX4 en el protocolo del fondo. El eje y representa la expresión genética relativa.

La Figura 19 es un esquema que representa la formación de tejido del intestino, tejido de fondo y tejido de antro a partir del endodermo definitivo.

Descripción detallada

A menos que se indique lo contrario, los términos deben entenderse de acuerdo con el uso convencional por los expertos en la técnica relevante.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "células madre totipotentes" (también conocidas como células madre omnipotentes) son células madre que pueden diferenciarse en tipos de células embrionarias y extraembrionarias y excluye las células madre obtenidas por métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos. Tales células pueden construir un organismo completo y viable.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "células madre pluripotentes (PSC)" abarca cualquier célula que pueda diferenciarse en casi todos los tipos de células del cuerpo y excluye las células obtenidas por métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos. Las PSC comprenden células derivadas de cualquiera de las tres capas germinales (epitelio germinal), incluido el endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, urogenital) y ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Las PSC pueden obtenerse mediante la inducción de una célula no pluripotente, tal como una célula somática adulta, al forzar la expresión de ciertos genes. Las células madre pluripotentes pueden derivarse de cualquier fuente adecuada, como comprenderá fácilmente un experto en la técnica. Los ejemplos de fuentes de células madre pluripotentes incluyen fuentes de mamíferos, que incluyen humanos, roedores, porcinos, bovinos, pero no se limitan a ellos.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "células madre pluripotentes inducidas (iPSC)", también abreviada comúnmente como células iPS, se refiere a un tipo de células madre pluripotentes derivadas artificialmente de una célula normalmente no pluripotente, tal como una célula somática adulta, al inducir una expresión "forzada" de ciertos genes.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "células madre embrionarias (ESC)", también abreviada comúnmente como células ES, se refiere a células que son pluripotentes y excluyen las células obtenidas por métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "célula precursora" abarca cualquier célula que pueda usarse en los métodos descritos en la presente descripción, a través de los cuales una o más células precursoras adquieren la capacidad de autorrenovarse o diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas y excluye las células obtenidas por métodos que implican necesariamente la destrucción de embriones humanos. En algunas modalidades, una célula precursora es pluripotente o tiene la capacidad de volverse pluripotente. En algunas modalidades, las células precursoras se someten al tratamiento de factores externos (por ejemplo, factores de crecimiento) para adquirir pluripotencia. En algunas modalidades, una célula precursora puede ser una célula madre totipotente (u omnipotente); una célula madre pluripotente (inducida o no inducida); una célula madre multipotente; una célula madre oligopotente y una célula madre unipotente. En algunas modalidades, una célula precursora puede ser de un bebé, un niño o un adulto. En algunas modalidades, una célula precursora puede ser una célula somática sometida a tratamiento de manera que la pluripotencia se confiera mediante manipulación genética o tratamiento de proteína/péptido.

En biología del desarrollo, la diferenciación celular es el proceso mediante el cual una célula menos especializada se convierte en un tipo de célula más especializada. Como se usa en la presente descripción, el término "diferenciación dirigida" describe un proceso a través del cual una célula menos especializada se convierte en un tipo de célula diana especializada particular. La particularidad del tipo de célula diana especializada puede determinarse mediante cualquiera de los métodos aplicables que pueda usarse para definir o alterar el destino de la célula inicial excluyendo los métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos. Los métodos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, manipulación genética, tratamiento químico, tratamiento de proteínas y tratamiento de ácidos nucleicos y excluyen métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos.

Como se usa en la presente descripción, la expresión "constituyentes celulares" son genes individuales, proteínas, genes que expresan ARNm y/o cualquier otro componente celular variable o actividades proteicas tales como el grado de modificación de la proteína (por ejemplo, fosforilación), por ejemplo, que se mide típicamente en experimentos biológicos (por ejemplo, mediante micromatrices o inmunohistoquímica) por los expertos en la técnica. Los descubrimientos significativos relacionados con las complejas redes de procesos bioquímicos que subyacen a los sistemas vivos, las enfermedades humanas comunes y el descubrimiento de genes y la determinación de la estructura ahora pueden atribuirse a la aplicación de datos de abundancia de constituyentes celulares como parte del proceso de investigación. Los datos de abundancia de constituyentes celulares pueden ayudar a identificar biomarcadores, discriminar subtipos de enfermedades e identificar mecanismos de toxicidad.

Las células madre se encuentran en todos los organismos multicelulares. Se caracterizan por la capacidad de autorrenovarse a través de la división celular mitótica y diferenciarse en una amplia gama de tipos celulares especializados. En los organismos adultos, las células madre y las células progenitoras actúan como un sistema de reparación para el cuerpo, reponiendo células especializadas, pero también manteniendo la renovación normal de los órganos regenerativos, tales como la sangre, la piel o los tejidos gástricos.

Las células madre ahora pueden cultivarse y transformarse en células especializadas con características consistentes con células de varios tejidos, tales como músculos o nervios, a través del cultivo celular. Las células

madre adultas altamente plásticas de una variedad de fuentes, incluida la sangre del cordón umbilical y la médula ósea, se usan de forma rutinaria en terapias médicas.

La definición clásica de una célula madre es típicamente indicativa de dos propiedades: autorrenovación, la capacidad de atravesar numerosos ciclos de división celular mientras que mantiene el estado indiferenciado, y potencia, la capacidad de diferenciarse en tipos de células especializadas. En algunas modalidades, las células madre son totipotentes o pluripotentes, *es decir*, pueden dar lugar a cualquier tipo de célula madura, aunque las células progenitoras multipotentes o unipotentes a veces pueden denominarse células madre.

La potencia especifica el potencial de diferenciación (el potencial para diferenciarse en diferentes tipos de células) de la célula madre. Las células madre totipotentes (también conocidas como células madre omnipotentes) pueden diferenciarse en tipos de células embrionarias y extraembrionarias. Estas células pueden construir un organismo completo y viable. Las células madre pluripotentes (PSC) son descendientes de las células totipotentes y pueden diferenciarse en casi todas las células, *es decir*, células derivadas de cualquiera de las tres capas germinales, incluido el endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, urogenital) y ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Las células madre multipotentes pueden diferenciarse en varias células, pero solo en las de una familia de células estrechamente relacionada. Las células madre oligopotentes pueden diferenciarse en solo unas pocas células, tales como las células madre linfoides o mieloides. Las células unipotentes pueden producir sólo un tipo de célula, el propio, pero tienen la propiedad de autorrenovación que las distingue de las células no madre (por ejemplo, células madre musculares).

Las células madre pluripotentes embrionarias e inducidas han tenido un impacto sin precedentes en la capacidad de estudiar enfermedades humanas y generar tejidos de reemplazo que son terapéuticamente eficaces en modelos animales.

En biología del desarrollo, la diferenciación celular es el proceso mediante el cual una célula menos especializada se convierte en un tipo de célula más especializada. Los esfuerzos más exitosos para dirigir la diferenciación de las CEP humanas en tipos de células terapéuticas se han basado en estudios del desarrollo de órganos embrionarios. Los ejemplos incluyen la generación de hepatocitos hepáticos y células endocrinas pancreáticas, que han mostrado potencial funcional en modelos animales de enfermedad hepática y diabetes. De manera similar, la diferenciación de las CEP en el intestino puede proporcionar un beneficio terapéutico para enfermedades como la enterocolitis necrotizante, las enfermedades inflamatorias del intestino y los síndromes del intestino corto.

Como se mencionó anteriormente, una célula madre pluripotente tiene el potencial de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales: endodermo (revestimiento interior del estómago, tracto gastrointestinal, los pulmones), mesodermo (músculo, hueso, sangre, urogenital) y ectodermo (tejidos epidérmicos y sistema nervioso). Como tal, las células madre pluripotentes pueden dar lugar a cualquier tipo de célula fetal o adulta. Sin embargo, el destino de las células madre pluripotentes particulares está controlado por numerosas vías de señalización celular y numerosos factores. Además, las células madre pluripotentes solas no pueden convertirse en un animal fetal o adulto porque carecen del potencial para contribuir al tejido extraembrionario, tal como la placenta.

Hasta la fecha, los tejidos gástricos no se han generado a partir de células madre pluripotentes humanas (hPSC). Los esfuerzos exitosos para diferenciar las PSC en células pulmonares, hepáticas, pancreáticas e intestinales han dependido de una sólida comprensión molecular del desarrollo embrionario de estos órganos.<sup>6-10</sup> Desafortunadamente, un problema en la técnica son las muchas lagunas en la comprensión del desarrollo del estómago posterior a la formación del endodermo. Por lo tanto, para dirigir la diferenciación de las hPSC en tejido gástrico, el solicitante identificó las vías de señalización que regulan varias etapas críticas del desarrollo temprano del estómago, incluida la especificación y el patrón del intestino anterior, la especificación gástrica y, por último, el crecimiento y la diferenciación del epitelio gástrico. Además, para generar tejido tridimensional más complejo y funcional, el solicitante se propuso inducir varios procesos morfogénicos que se producen durante el desarrollo del estómago incluidos la morfogénesis del tubo del intestino anterior y la formación de estructuras epiteliales gástricas que incluyen glándulas y fosas.

Como se describe en la presente descripción, los métodos y sistemas se establecen con el uso de una serie temporal de manipulaciones del factor de crecimiento para imitar el desarrollo de tejido gástrico embrionario en cultivo. En particular, se establecen métodos y sistemas para dirigir *in vitro* la diferenciación de las PSC, tanto las células madre embrionarias humanas (hESC) excluidas las hESC obtenidas por métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos, como las células madre pluripotentes inducidas (iPSC), en tejido gástrico. Estos factores dirigieron el desarrollo intestinal humano *in vitro* en etapas que se aproximan al desarrollo intestinal fetal: formación de endodermo definitivo (DE) inducida por activina; formación de patrones de intestino anterior posterior inducido por FGF/Wnt/BMP y, finalmente, un sistema de cultivo progástrico obtenido mediante la modulación de la señalización de ácido retinoico y de EFG que promovió el crecimiento del tejido gástrico, la morfogénesis y la citodiferenciación en tipos de células gástricas funcionales y la morfología, incluidas glándulas y fosas gástricas, zonas proliferativas, células mucosas superficiales y antrales, y células endocrinas que expresan gastrina, grelina y somatostatina.

El solicitante ha identificado nuevas vías de señalización embrionarias que permiten la diferenciación gradual y eficiente de las PSC humanas en células gástricas, tejidos gástricos y/o tejido gástrico tridimensional (hGO) con arquitectura y composición celular complejas. El solicitante ha descubierto además que los hGO en desarrollo se someten a etapas de diferenciación molecular y morfológica que son casi idénticas al antro en desarrollo del ratón, y que los organoides gástricos resultantes pueden contener una serie de células mucosas, endocrinas y progenitoras que constituyen el epitelio antral normal y una organización tridimensional comparable al estómago fetal/postnatal.

Las células gástricas humanas, el tejido gástrico y/o los organoides gástricos (hGO) descritos pueden usarse como un sistema *in vitro* para identificar nuevos mecanismos de desarrollo y fisiología del estómago humano, y pueden usarse como modelo de la respuesta fisiopatológica del epitelio gástrico a *H. pylori*. Las células gástricas, el tejido gástrico y/o los hGO gástricos y los métodos descritos presentan nuevas oportunidades para el descubrimiento de fármacos y el modelado de las primeras etapas del cáncer gástrico. Además, en la presente descripción se describe la primera producción tridimensional de un intestino anterior embrionario humano, que es un punto de partida prometedor para la generación de otros tejidos de órganos del intestino anterior, incluidos los pulmones y el páncreas.

En un aspecto, se describe un método *in vitro* para inducir la formación de una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico a partir de una célula precursora. El método comprende las etapas de:

a) activar una o más vías de señalización dentro de una célula precursora, en donde una o más vías de señalización se seleccionan de la combinación de una vía de señalización WNT y una vía de señalización FGF para obtener una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico descendiente de la célula precursora, en donde dicha vía de señalización WNT se activa con el uso de un agente seleccionado de una o más moléculas seleccionadas del grupo que consiste en Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, y activadores de moléculas pequeñas de la vía de señalización WNT, y dicha vía de señalización FGF se activa con el uso de un agente seleccionado de una o más moléculas seleccionadas del grupo que consiste en FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, y FGF23,

b) inhibir una vía de señalización BMP dentro de dicha célula precursora al poner en contacto dicha célula precursora con un inhibidor de BMP; y

c) poner en contacto dicha célula precursora con ácido retinoico;

en donde las etapas a) a c) se llevan a cabo durante un período de tiempo suficiente para provocar la formación de un esferoide del intestino anterior, que comprende además la etapa de poner en contacto dicho esferoide del intestino anterior con EGF.

El contacto de una célula precursora con ácido retinoico puede producirse después de las etapas de activación e inhibición anteriores.

La etapa de poner en contacto un organoide gástrico con EGF puede ser a una concentración y/o un período de tiempo suficiente para aumentar el diámetro del organoide gástrico a más de aproximadamente 1 mm de diámetro, o más de aproximadamente 2 mm de diámetro, o más de aproximadamente 3 mm de diámetro, o más de aproximadamente 4 mm de diámetro.

En un aspecto, el inhibidor de BMP puede seleccionarse de Dorsomorfina, LDN189, DMH-1, Noggin y combinaciones de estos. En un aspecto, el inhibidor de BMP puede ser Noggin.

En un aspecto, la etapa de activación puede comprender poner en contacto una célula precursora con Wnt3a, FGF4 y un inhibidor de BMP durante un período especificado que se denomina período de incubación. Las etapas de contacto pueden producirse simultáneamente o, en otros aspectos, las etapas de contacto pueden producirse posteriormente.

En un aspecto, una célula precursora, que puede comprender endodermo definitivo, puede ponerse en contacto con un agente de señalización que puede comprender 1) Wnt3a o un inhibidor de GSK (por ejemplo, CHIRON) en combinación con 2) FGF4, durante un primer período de incubación. El primer período de incubación comprende además un inhibidor de BMP. Después del primer período de incubación, la célula precursora se somete a un segundo período de incubación en donde las células precursoras se ponen en contacto con ácido retinoico (RA). En un aspecto, el primer período de incubación y el segundo período de incubación se superponen. En algunas modalidades, el primer período de incubación y el segundo período de incubación no se superponen.

En un aspecto, el primer y/o segundo período de incubación, y/o la totalidad del primer y segundo período de incubación puede ser de entre 24 y 120 horas, o de aproximadamente 36 a aproximadamente 108 horas, o de aproximadamente 48 a aproximadamente 96 horas, o de aproximadamente 60 a aproximadamente 84 horas. En un aspecto, el primer período de incubación puede ser de al menos aproximadamente 24 horas.

En un aspecto, el segundo período de incubación (en donde las células precursoras pueden ponerse en contacto con RA) comienza aproximadamente 72 horas después del primer período de incubación. En un aspecto adicional, el segundo período de incubación comienza después de que los cultivos hayan formado esferoides del intestino anterior a partir de las células precursoras. Los esferoides del intestino anterior pueden transferirse después a una matriz tridimensional en condiciones de crecimiento adecuadas para la formación de un organoide gástrico, por ejemplo, mediante la aplicación de los esferoides del intestino anterior a Matrigel™ (Corning, BD Bioscience). Después de la transferencia a Matrigel, los esferoides del intestino anterior se ponen en contacto con RA durante un tercer período de incubación en el que puede producirse un crecimiento tridimensional continuo. A continuación, los esferoides se ponen en contacto con EGF durante un cuarto período de incubación, que puede superponerse con el tercer período de incubación. El tercer período de incubación puede ser de aproximadamente 24 horas.

En un aspecto, la célula precursora puede ponerse en contacto con Wnt3a a una concentración entre 50-1500 ng/ml, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 1200 ng/ml, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 ng/ml, o de aproximadamente 300 a aproximadamente 900 ng/ml, o de aproximadamente 400 a aproximadamente 800 ng/ml, o de aproximadamente 500 a aproximadamente 700 ng/ml.

En un aspecto, la célula precursora puede seleccionarse de una célula madre embrionaria, una célula madre pluripotente inducida, una célula de mesodermo, una célula de endodermo definitiva, una célula de endodermo posterior y una célula del intestino posterior.

En un aspecto, la célula precursora puede ser una célula de endodermo definitivo derivada de una célula madre pluripotente.

En un aspecto, la célula precursora puede ser una célula madre pluripotente tal como una célula madre embrionaria, una célula madre adulta o una célula madre pluripotente inducida.

En un aspecto, la célula de endodermo definitivo puede derivarse al poner en contacto la célula madre pluripotente con una o más moléculas seleccionadas de Activina, los subgrupos de BMP de la superfamilia TGF-beta de factores de crecimiento; Nodal, Activina A, Activina B, BMP4, Wnt3a y una combinación de estos.

En un aspecto, puede producirse un tejido gástrico *in vitro* a partir de una o más células precursoras.

En un aspecto, la una o más células precursoras pueden seleccionarse de una célula madre embrionaria, una célula de mesodermo, una célula de endodermo definitivo, una célula de endodermo posterior, una célula de endodermo anterior, una célula del intestino anterior y una célula del intestino posterior.

En un aspecto, la célula madre pluripotente puede ser una célula madre pluripotente de mamífero, que incluye pero no se limita a una célula madre pluripotente humana o una célula madre pluripotente de ratón.

En un aspecto, la célula madre pluripotente humana puede seleccionarse de una célula madre embrionaria humana y una célula madre pluripotente humana inducida. En la presente descripción se describe un kit que comprende una célula, tejido u organoide gástrico producido *in vitro* a partir de una o más células precursoras.

En la presente descripción se describe un método para identificar el efecto de absorción de células o tejidos gástricos. El método puede comprender las etapas de poner en contacto una célula, tejido u organoide gástrico derivado de una célula precursora con un compuesto; y detectar un nivel de absorción de un compuesto por dichas células o tejidos gástricos.

En la presente se describe un método para identificar la toxicidad de un compuesto en una célula o tejido gástrico. El método puede comprender las etapas de poner en contacto una célula, tejido u organoide gástrico derivado de una célula precursora con un compuesto; y detectar un nivel de absorción de un compuesto por dichas células o tejidos gástricos.

En la presente descripción se describen composiciones que comprenden organoides gástricos humanos tridimensionales (hGO) generados *de novo*, y métodos para producirlos mediante la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes humanas (hPSC). Tales hGO pueden usarse para modelar el desarrollo del estómago, así como también los eventos tempranos que se producen durante la infección por *H. pylori*.

En la presente descripción se describen métodos para generar un hGO *in vitro* mediante la diferenciación dirigida de células madre pluripotentes humanas (hPSC). Este tejido gástrico humano puede usarse para modelar el desarrollo y la enfermedad del estómago humano. También se describen métodos para inducir el endodermo definitivo (DE) para formar estructuras de tubo intestinal tridimensionales. En un aspecto, esto puede llevarse a cabo al activar la señalización de FGF y WNT, mientras que el destino del intestino anterior puede promoverse al inhibir simultáneamente la señalización de BMP. Los esferoides del intestino anterior pueden entonces dirigirse a un intestino anterior posterior y al destino gástrico mediante la manipulación de la señalización de ácido retinoico y de EGF, lo que da como resultado los hGO.

Los hGO en desarrollo pueden sufrir cambios moleculares y morfogénicos casi idénticos al antro del ratón en desarrollo, formando glándulas y fosas gástricas, zonas proliferativas, células de las mucosas superficiales y antrales, y células endocrinas que expresan gastrina, grelina y somatostatina. Con el uso de los hGO para modelar el desarrollo del estómago humano, se ha determinado que la señalización de EGF reprime el desarrollo de células endocrinas corriente arriba del factor de transcripción NEUROGENINA 3. El solicitante ha descubierto además que los hGO recapitulan fielmente las primeras etapas de la enfermedad gástrica iniciada por *H. pylori*, incluida la activación rápida de la señalización de c-Met y la proliferación epitelial. Juntos, estos estudios describen un sistema *in vitro* novedoso y robusto para dilucidar los mecanismos subyacentes al desarrollo y la enfermedad del estómago humano.

Células madre pluripotentes derivadas de células embrionarias

En un aspecto, los métodos pueden incluir la etapa de obtener células madre que son pluripotentes o que pueden inducirse a convertirse en pluripotentes y excluir métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

En algunas modalidades, las iPSC se derivan por transfección de ciertos genes asociados a células madre en células no pluripotentes, tales como fibroblastos adultos. La transfección se logra típicamente a través de vectores virales, tales como los retrovirus. Los genes transfectados incluyen los reguladores transcripcionales maestros Oct-3/4 (Pou5f1) y Sox2, aunque se sugiere que otros genes mejoran la eficiencia de la inducción. Después de 3-4 semanas, pequeñas cantidades de células transfectadas comienzan a volverse morfológicamente y bioquímicamente similares a las células madre pluripotentes, y típicamente se aíslan mediante selección morfológica, tiempo de duplicación o mediante un gen indicador y selección de antibióticos. Como se usa en la presente descripción, las iPSC pueden incluir, pero no se limitan a, iPSC de primera generación, iPSC de segunda generación en ratones y células madre pluripotentes inducidas por humanos. En algunas modalidades, puede usarse un sistema retroviral para transformar fibroblastos humanos en células madre pluripotentes con el uso de cuatro genes fundamentales: Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc. En modalidades alternativas, se usa un sistema lentiviral para transformar células somáticas con OCT4, SOX2, NANOG y LIN28. Los genes cuya expresión puede inducirse en iPSC incluyen, pero no se limitan a, Oct-3/4 (por ejemplo, Pou5f1); ciertos miembros de la familia de genes Sox (por ejemplo, Sox1, Sox2, Sox3 y Sox15); ciertos miembros de la familia Klf (por ejemplo, Klf1, Klf2, Klf4 y Klf5), ciertos miembros de la familia Myc (por ejemplo, C-myc, L-myc y N-myc), Nanog y LIN28.

En algunas modalidades, pueden emplearse tecnologías no virales para generar las iPSC. En algunas modalidades, puede usarse un adenovirus para transportar los cuatro genes necesarios al ADN de las células de la piel y del hígado de los ratones, lo que da como resultado células idénticas a las células madre embrionarias. Dado que el adenovirus no combina ninguno de sus propios genes con el huésped diana, se elimina el peligro de crear tumores. En algunas modalidades, la reprogramación puede realizarse mediante un plásmido sin ningún sistema de transfección de virus, aunque con eficiencias muy bajas. En otras modalidades, se usa el suministro directo de proteínas para generar las iPSC, lo que elimina de este modo la necesidad de virus o de modificación genética. En alguna modalidad, la generación de las iPSC de ratón es posible con el uso de una metodología similar: un tratamiento repetido de las células con ciertas proteínas canalizadas hacia las células mediante anclajes de poliarginina fue suficiente para inducir la pluripotencia. En algunas modalidades, la expresión de genes de inducción de pluripotencia también puede aumentarse mediante el tratamiento de células somáticas con FGF2 en condiciones de bajo oxígeno.

Pueden encontrarse más detalles sobre las células madre embrionarias, por ejemplo, en Kaji y otros, 2009, "Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors," Nature 458:771-775; Woltjen y otros, 2009, "piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells," Nature 458:766-770; Okita y otros, 2008, "Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors," Science 322(5903):949-953; Stadtfeld y otros, 2008, "Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration," Science 322(5903):945-949; y Zhou y otros, 2009, "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins," Cell Stem Cell 4(5):381-384.

En algunas modalidades, las líneas celulares de iPS ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, iPS-DF19-9; iPS-DF19-9; iPS-DF4-3; iPS-DF6-9; iPS(Prepucio); iPS(IMR90); e iPS(IMR90).

Se ha demostrado que las iPSC eran capaces de diferenciarse de forma similar a las ESC en tejidos completamente diferenciados. Por ejemplo, las iPSC se diferenciaron en neuronas que expresan  $\beta$ III-tubulina, tirosina hidroxilasa, AADC, DAT, ChAT, LMX1B y MAP2. La presencia de enzimas asociadas a catecolaminas puede indicar que las iPSC, como las hESC, pueden diferenciarse en neuronas dopaminérgicas. Se demostró que los genes asociados a las células madre se regulan negativamente después de la diferenciación. También se ha demostrado que las iPSC pueden diferenciarse en cardiomiocitos que comienzan a latir espontáneamente. Los cardiomiocitos expresaron TnTc, MEF2C, MYL2A, MYHC $\beta$  y NKX2.5. Los genes asociados a las células madre se regularon negativamente después de la diferenciación.



## Órgano y desarrollo gástrico

Antes de la invención del solicitante, no se disponía de sistemas para convertir células precursoras tales como células madre embrionarias y/o iPSC en tejidos gástricos.

En algunas modalidades, las PSC, tales como las ESC que excluyen las ESC obtenidas por métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos, y las iPSC, experimentan una diferenciación dirigida de manera gradual primero en endodermo definitivo (DE) y después en estructuras tridimensionales de tubo intestinal (esferoides del intestino anterior) y después en organoide gástrico (hGO) tridimensional a través de la formación de un tejido de intestino anterior posterior/gástrico.

En algunas modalidades, las PSC, tales como las ESC que excluyen las ESC obtenidas por métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos, y las iPSC, experimentan diferenciación dirigida de una manera no gradual donde moléculas (por ejemplo, factores de crecimiento, ligandos) para promover la formación de DE y al mismo tiempo se añaden aquellos para la formación posterior de tejido.

## Endodermo definitivo

El epitelio del estómago se deriva de una simple lámina de células llamada endodermo definitivo (DE). El DE anterior forma el intestino anterior y sus órganos asociados, incluidos los pulmones, el esófago, el estómago, el hígado y el páncreas, y el DE posterior forma el intestino medio y posterior, que forma los intestinos delgado y grueso y partes del sistema genitourinario. El DE da lugar a los epitelios de los tractos gastrointestinal y respiratorio *in vivo*. Los estudios que usan embriones de ratón, pollo y rana sugieren que el establecimiento del patrón anteroposterior en el DE en la etapa de gástrula es un requisito previo para el desarrollo posterior del intestino anterior y el intestino posterior. En algunas modalidades, las PSC, tales como las ESC que excluyen las ESC obtenidas por métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos, y las iPSC, experimentan una diferenciación dirigida de manera gradual primero en el endodermo definitivo (DE) y después en el epitelio del intestino anterior/anterior (por ejemplo, esferoides del intestino anterior) y después en el tejido gástrico. Se cree que las vías de señalización BMP, Wnt y FGF son críticas para este proceso. La activación de WNT y FGF actúa para promover la morfogénesis del tubo intestinal y la inhibición de la señalización de BMP promueve un destino del intestino anterior. El epitelio cuboidal simple del intestino anterior se desarrolla primero en un epitelio columnar pseudoestratificado, después en glándulas y hoyos que contienen epitelio gástrico y una zona proliferativa en la base de las vellosidades, que se corresponde con el dominio progenitor presuntivo.

Se establece un proceso robusto y eficiente para dirigir la diferenciación del DE en tejido gástrico *in vitro*. En algunas modalidades, la diferenciación dirigida se logra al activar selectivamente ciertas vías de señalización en las iPSC y/o células del DE. En algunas modalidades, las vías de señalización son aquellas activas en el desarrollo de tejido gástrico, que incluyen pero no se limitan a la vía de señalización Wnt, vía de señalización Wnt/APC, vía de señalización FGF, vía de señalización de TGF-beta, vía de señalización de BMP; vía de señalización de EGF y vía de señalización del ácido retinoico.

Pueden encontrarse más detalles sobre las funciones de las vías de señalización relacionadas con el desarrollo del DE y/o el desarrollo intestinal en general, por ejemplo, en Zorn y Wells, 2009, "Vertebrate endoderm development and organ formation," *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:221-251; Dessimoz y otros, 2006, "FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis *in vivo*," *Mech Dev* 123:42-55; McLin y otros, 2007, "Repression of Wnt/{beta}-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development. Development," 134:2207-2217; Wells y Melton, 2000, *Development* 127:1563-1572; de Santa Barbara y otros, 2003, "Development and differentiation of the intestinal epithelium," *Cell Mol Life Sci* 60(7): 1322-1332; Sancho y otros, 2004, "Signaling Pathways in Intestinal Development and Cancer," *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20:695-723; Logan y Nusse, 2004, "The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease," *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20:781-810; Taipale y Beachy, 2001, "The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer," *Nature* 411:349-354; Gregorieff y Clevers, 2005, "Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer," *Genes & Dev.* 19: 877-890.

Cualquier método para producir endodermo definitivo a partir de células pluripotentes (por ejemplo, iPSC o ESC) que no implica necesariamente la destrucción de embriones humanos es aplicable a los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, las células madre pluripotentes son células madre. Las células madre usadas en estos métodos pueden incluir, pero no se limitan a, células madre embrionarias. Las células madre embrionarias pueden originarse a partir de una variedad de especies animales que incluyen, pero no se limitan a, varias especies de mamíferos, incluidos los seres humanos. En algunas modalidades, las células madre embrionarias humanas que excluyen las hESC obtenidas mediante métodos que implican necesariamente la destrucción de embriones humanos se usan para producir endodermo definitivo. En algunas modalidades, las iPSC se usan para producir endodermo definitivo.

En algunas modalidades, se usan uno o más factores de crecimiento en el proceso de diferenciación de células madre pluripotentes a células de DE. El uno o más factores de crecimiento usados en el proceso de diferenciación pueden incluir factores de crecimiento de la superfamilia TGF-beta. En tales modalidades, el uno o más factores de crecimiento comprenden los subgrupos Nodal/Activina y/o BMP de la superfamilia de factores de crecimiento TGF-

beta. En algunas modalidades, el uno o más factores de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste en Nodal, Activina A, Activina B, BMP4, Wnt3a o combinaciones de cualquiera de estos factores de crecimiento.

En algunas modalidades, las células madre embrionarias o las células pluripotentes inducidas y las iPSC se tratan con uno o más factores de crecimiento durante 6 horas o más; 12 horas o más; 18 horas o más; 24 horas o más; 36 horas o más; 48 horas o más; 60 horas o más; 72 horas o más; 84 horas o más; 96 horas o más; 120 horas o más; 150 horas o más; 180 horas o más; o 240 horas o más.

En algunas modalidades, las células madre embrionarias y las iPSC se tratan con uno o más factores de crecimiento a una concentración de 10 ng/ml o superior; 20 ng/ml o más; 50 ng/ml o más; 75 ng/ml o más; 100 ng/ml o más; 120 ng/ml o más; 150 ng/ml o más; 200 ng/ml o más; 500 ng/ml o más; 1000 ng/ml o más; 1200 ng/ml o más; 1500 ng/ml o más; 2000 ng/ml o más; 5000 ng/ml o más; 7000 ng/ml o más; 10 000 ng/ml o más; o 15 000 ng/ml o más. En algunas modalidades, la concentración del factor de crecimiento se mantiene a un nivel constante durante todo el tratamiento. En otras modalidades, la concentración del factor de crecimiento se varía durante el curso del tratamiento. En algunas modalidades, el factor de crecimiento se suspende en medios que incluyen serina bovina fetal (FBS) con concentraciones variables de HyClone. Un experto en la técnica comprenderá que el régimen descrito en la presente descripción es aplicable a cualquier factor de crecimiento conocido, solo o en combinación. Cuando se usan dos o más factores de crecimiento, la concentración de cada factor de crecimiento puede variarse de forma independiente.

En algunas modalidades, se usan poblaciones de células enriquecidas en células de endodermo definitivo. En algunas modalidades, las células de endodermo definitivo se aíslan o se purifican sustancialmente. En algunas modalidades, las células de endodermo definitivo aisladas o sustancialmente purificadas expresan el marcador SOX17, FOXA2 y/o CXCR4 en mayor medida que los marcadores OCT4, AFP, TM, SPARC y/o SOX7.

También se contemplan métodos para enriquecer una población celular con endodermo definitivo. En algunas modalidades, las células de endodermo definitivo pueden aislarse o purificarse sustancialmente a partir de una población celular mixta al poner en contacto las células con un reactivo que se une a una molécula que está presente en la superficie de las células de endodermo definitivo pero que no está presente en la superficie de otras células en la población de células mixtas, y después aislar las células unidas al reactivo. En determinadas modalidades, el constituyente celular que está presente en la superficie de las células de endodermo definitivo es CXCR4.

Aún otras modalidades de la presente invención se refieren a anticuerpos CXCR4, pueden usarse ligandos SDF-1 u otros ligandos para CXCR4 para obtener células de endodermo definitivo en una forma enriquecida, aislada o sustancialmente purificada. Por ejemplo, un anticuerpo CXCR4, un ligando SDF-1 u otro ligando para CXCR4 puede usarse como reactivo en un método, tal como la separación basada en afinidad o la separación magnética, para enriquecer, aislar o purificar sustancialmente preparaciones de células de endodermo definitivo que se unen al reactivo.

En algunas modalidades, las células de endodermo definitivo y las hESC que excluyen las hESC obtenidas mediante métodos que implican necesariamente la destrucción de embriones humanos, se tratan con uno o más factores de crecimiento. Tales factores de crecimiento pueden incluir factores de crecimiento de la superfamilia TGF-beta. En tales modalidades, el uno o más factores de crecimiento comprenden los subgrupos Nodal/Activina y/o BMP de la superfamilia de factores de crecimiento TGF-beta. En algunas modalidades, el uno o más factores de crecimiento se seleccionan del grupo que consiste en Nodal, Activina A, Activina B, BMP4, Wnt3a o combinaciones de cualquiera de estos factores de crecimiento.

#### Diferenciación dirigida de DE posteriorizado

En algunas modalidades, el endodermo definitivo (DE) inducido por activina puede experimentar además un patrón de endodermo anterior inducido por FGF/Wnt/Noggin, especificación y morfogénesis del intestino anterior, y finalmente un sistema de cultivo progástrico para promover el crecimiento del tejido gástrico, la morfogénesis y la citodiferenciación en tipos de células gástricas funcionales que incluyen células mucosas superficiales, células de glándulas mucosas, células endocrinas y progenitoras. En algunas modalidades, las PSC humanas se dirigen eficazmente para diferenciarse *in vitro* en epitelio gástrico que incluye tipos de células mucosas, endocrinas y progenitoras. Se entenderá que pueden añadirse moléculas tales como factores de crecimiento a cualquier etapa del desarrollo para promover un tipo particular de formación de tejido gástrico.

En algunas modalidades, las células de endodermo anteriorizado del DE se desarrollan adicionalmente en uno o más tipos de células especializadas.

En algunas modalidades, se usan ligandos solubles de FGF y Wnt y antagonistas de BMP para imitar la especificación temprana en el cultivo para convertir, mediante diferenciación directa, DE desarrollado a partir de iPSC o ESC, con exclusión de las ESC obtenidas por métodos que necesariamente implican la destrucción de embriones humanos, en epitelio del intestino anterior que da lugar de manera eficiente a todos los principales tipos

de células gástricas del antro. En seres humanos, la diferenciación dirigida de DE se logra mediante la activación selectiva de ciertas vías de señalización que son importantes para el desarrollo gástrico.

El desarrollo estomacal/gástrico humano *in vitro* se produce en etapas que se aproximan al desarrollo intestinal fetal; formación de endodermo, patrón de endodermo anterior, morfogénesis del intestino anterior, desarrollo fetal gástrico, antral y fúndico, morfogénesis epitelial, formación de un dominio progenitor presunto y diferenciación en tipos de células funcionales del estómago.

Un experto en la técnica entenderá que la alteración de la expresión de cualquier proteína de señalización Wnt en combinación con cualquier ligando de FGF puede dar lugar a una diferenciación dirigida de acuerdo con la presente invención. En algunas modalidades, la alteración es la sobreexpresión de Wnt3, en particular Wnt3a. En algunas modalidades, la alternancia es la sobreexpresión de Wnt1 u otros ligandos de Wnt.

Un experto en la técnica entenderá que la alteración de la actividad de señalización de la vía de señalización Wnt en combinación con la alteración de la actividad de señalización de la vía de señalización FGF puede dar lugar a una diferenciación dirigida de acuerdo con la presente invención. En algunas modalidades, la alteración se realiza mediante el uso de moduladores de moléculas pequeñas que activan las vías antes mencionadas. Por ejemplo, los moduladores de molécula pequeña de la vía Wnt incluyen, pero no se limitan a, cloruro de litio; (hetero) arilpirimidinas con pirimidina 2-amino-4,6-disustituida; IQ1; QS11; NSC668036; Beta-catenina DCA; 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)-bencil-amino]-6-(3-metoxifenil) pirimidina.

En modalidades alternativas, los constituyentes celulares asociados con las vías de señalización Wnt y/o FGF, por ejemplo, inhibidores naturales o antagonistas de las vías pueden inhibirse para dar como resultado la activación de las vías de señalización Wnt y/o FGF.

En alguna modalidad, los constituyentes celulares son inhibidos por otros constituyentes celulares o moléculas extrínsecas. Los inhibidores naturales ilustrativos de la señalización Wnt incluyen, pero no se limitan a, Dkk1, proteínas SFRP y FrzB. En algunas modalidades, las moléculas extrínsecas pueden incluir, pero no se limitan a, moléculas pequeñas tales como WAY-316606; SB-216763; o BIO (6-bromoindirubin-3'-oxima).

Se encuentran más detalles, por ejemplo, en Liu y otros, "A small-molecule agonist of the Wnt signaling pathway," *Angew Chem Int Ed Engl.* 44(13):1987-1990 (2005); Miyabayashi y otros, "Wnt/beta-catenin/CBP signaling maintains long-term murine embryonic stem cell pluripotency," *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(13):5668-5673 (2007); Zhang y otros, "Small-molecule synergist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway," *Proc Natl Acad Sci USA.* 104(18):7444-7448 (2007); Neiiendam y otros, "An NCAM-derived FGF-receptor agonist, the FGL-peptide, induces neurite outgrowth and neuronal survival in primary rat neurons," *J. Neurochem.* 91(4):920-935 (2004); Shan y otros, "Identification of a specific inhibitor of the dishevelled PDZ domain," *Biochemistry* 44(47):15495-15503 (2005); Coghlan y otros, "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription," *Chem. Biol.* 7(10):793-803 (2000); Coghlan y otros, "Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription," *Chemistry & Biology* 7(10):793-803; y Pai y otros, "Deoxycholic acid activates beta-catenin signaling pathway and increases colon cell cancer growth and invasiveness," *Mol Biol Cell.* 15(5):2156-2163 (2004).

En algunas modalidades, se usan ARNip y/o ARNhc que se dirigen a constituyentes celulares asociados con las vías de señalización Wnt y/o FGF para activar estas vías. Un experto en la técnica entenderá que los constituyentes celulares diana pueden incluir, pero no se limitan a, proteínas SFRP; GSK3, Dkk1 y FrzB.

Pueden encontrarse más detalles sobre tecnologías basadas en iARN, por ejemplo, en Couzin, 2002, *Science* 298:2296-2297; McManus y otros, 2002, *Nat. Rev. Genet.* 3, 737-747; Hannon, G. J., 2002, *Nature* 418, 244-251; Paddison y otros, 2002, *Cancer Cell* 2, 17-23; Elbashir y otros, 2001, *EMBO J.* 20:6877-6888; Tuschl y otros, 1999, *Genes Dev.* 13:3191-3197; Hutvagner y otros, *Scienceexpress* 297:2056-2060.

Los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) son una familia de factores de crecimiento implicados en la angiogénesis, la cicatrización de heridas y el desarrollo embrionario. Los FGF son proteínas de unión a heparina y se ha demostrado que las interacciones con proteoglicanos de heparán sulfato asociados a la superficie celular son esenciales para la transducción de señales FGF. Los FGF son actores clave en los procesos de proliferación y diferenciación de una amplia variedad de células y tejidos. En seres humanos, se han identificado 22 miembros de la familia FGF, todos los cuales son moléculas de señalización relacionadas estructuralmente. Los miembros FGF1 a FGF10 se unen todos a los receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR). FGF1 también se conoce como ácido y FGF2 también se conoce como factor de crecimiento de fibroblastos básico. Se ha demostrado que los miembros FGF11, FGF12, FGF13 y FGF14, también conocidos como factores homólogos de FGF 1-4 (FHF1-FHF4), tienen distintas diferencias funcionales en comparación con los FGF. Aunque estos factores poseen una homología de secuencia notablemente similar, no se unen a los FGFR y están implicados en procesos intracelulares no relacionados con los FGF. Este grupo también se conoce como "iFGF". Los miembros FGF16 a FGF23 son más nuevos y no están tan bien caracterizados. FGF15 es el ortólogo de ratón del FGF19 humano (por tanto, no es FGF15 humano). Se identificó el FGF20 humano basándose en su homología con *Xenopus* FGF-20 (XFGF-20). En

contraste con la actividad local de los otros FGF, FGF15/FGF19, FGF21 y FGF23 tienen efectos más sistémicos.

En algunas modalidades, un experto en la técnica entenderá que cualquiera de los FGF puede usarse junto con una proteína de la vía de señalización Wnt. En algunas modalidades, los FGF solubles pueden incluir, pero no se limitan a, FGF4, FGF2 y FGF3.

En alguna modalidad, los constituyentes celulares de la vía de señalización FGF son inhibidos por otros constituyentes celulares o moléculas extrínsecas. Los inhibidores naturales ilustrativos de la señalización FGF pueden incluir, pero no se limitan a, la familia de proteínas Sprouty y la familia de proteínas Spred. Como se discutió anteriormente, las proteínas, las moléculas pequeñas y los ácidos nucleicos pueden usarse para activar la vía de señalización FGF.

Un experto en la técnica entenderá que los métodos y composiciones descritos en la presente descripción en relación con las vías de señalización Wnt y FGF se proporcionan a modo de ejemplos. Son aplicables métodos y composiciones similares a otras vías de señalización descritas en la presente descripción.

En algunas modalidades, el cultivo de DE puede tratarse con una o más moléculas de una vía de señalización descrita en la presente descripción durante 6 horas o más; 12 horas o más; 18 horas o más; 24 horas o más; 36 horas o más; 48 horas o más; 60 horas o más; 72 horas o más; 84 horas o más; 96 horas o más; 120 horas o más; 150 horas o más; 180 horas o más; 200 horas o más; 240 horas o más; 270 horas o más; 300 horas o más; 350 horas o más; 400 horas o más; 500 horas o más; 600 horas o más; 700 horas o más; 800 horas o más; 900 horas o más; 1000 horas o más; 1200 horas o más; o 1500 horas o más.

En algunas modalidades, el cultivo de DE se trata con una o más moléculas de una vía de señalización descrita en la presente descripción a una concentración de 10 ng/ml o superior; 20 ng/ml o más; 50 ng/ml o más; 75 ng/ml o más; 100 ng/ml o más; 120 ng/ml o más; 150 ng/ml o más; 200 ng/ml o más; 500 ng/ml o más; 1000 ng/ml o más; 1200 ng/ml o más; 1500 ng/ml o más; 2000 ng/ml o más; 5000 ng/ml o más; 7000 ng/ml o más; 10 000 ng/ml o más; o 15 000 ng/ml o más. En algunas modalidades, la concentración de la molécula de señalización se mantiene constante durante todo el tratamiento. En otras modalidades, la concentración de las moléculas de una vía de señalización se varía durante el curso del tratamiento. En algunas modalidades, una molécula de señalización de acuerdo con la presente invención se suspende en un medio que comprende DMEM y serina bovina fetal (FBS). El FBS puede tener una concentración del 2 % o más; 5 % y más; 10 % o más; 15 % o más; 20 % o más; 30 % o más; o 50 % o más. Un experto en la técnica entendería que el régimen descrito en la presente descripción es aplicable a cualquier molécula conocida de las vías de señalización descritas en la presente descripción, solas o en combinación, incluidas, entre otras, cualquier molécula en las vías de señalización Wnt y FGF.

En modalidades en las que se usan dos o más moléculas de señalización para tratar el cultivo de DE, las moléculas de señalización pueden añadirse de forma simultánea o separada. Cuando se usan dos o más moléculas, la concentración de cada una puede variarse de forma independiente.

La diferenciación de las PSC en cultivo de DE y posteriormente en varios tipos de células gástricas maduras intermedias puede determinarse por la presencia de marcadores celulares específicos de la etapa. En algunas modalidades, se usa la expresión de constituyentes celulares representativos para determinar la formación de DE. Los componentes celulares representativos pueden incluir, entre otros, CMKOR1, CXCR4, GPR37, RTN4RL1, SLC5A9, SLC40A1, TRPA1, AGPAT3, APOA2, C20orf56, C21orf129, CALCR, CCL2, CER1, CMKOR1, CRIP1, CXCR4, CXorf1, DIO3, DIO30S, EB-1, EHHADH, ELOVL2, EPSTI1, FGF17, FLJ10970, FLJ21195, FLJ22471, FLJ23514, FOXA2, FOXQ1, GATA4, GPR37, GSC, LOC283537, MYL7, NPPB, NTN4, PRSS2, RTN4RL1, SEMA3E, SIAT8D, SLC5A9, SLC40A1, SOX17, SPOCK3, TMOD1, TRPA1, TTN, AW166727, AI821586, BF941609, AI916532, BC034407, N63706 y AW772192.

Pueden encontrarse constituyentes celulares adicionales adecuados para detectar la formación de DE, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 11/165,305, presentada el 23 de junio de 2005; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 11/317,387, presentada el 22 de diciembre de 2005; patente de Estados Unidos núm. de serie 11/021,618, presentada el 23 de diciembre de 2004; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 11/021,618, 11/115,868 presentada el 26 de abril de 2005; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 11/317,387, presentada el 22 de diciembre de 2005; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 11/474,211, presentada el 23 de junio de 2006; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 11/165,305, presentada el 23 de junio de 2005; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 11/587,735 presentada el 29 de agosto de 2008; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 12/039,701, presentada el 28 de febrero de 2008; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 12/414,482, presentada el 30 de marzo de 2009; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 12/476,570, presentada el 2 de junio de 2009; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 12/093,590 presentada el 21 de julio de 2008; solicitud de patente de Estados Unidos núm. de serie 12/582,600 presentada el 20 de octubre de 2009.

En algunas modalidades, la expresión de SOX2 se usa para revelar la tendencia a la formación del intestino anterior después de que se haya incubado el DE con FGF4 y Wnt3a más Noggin durante un período de tiempo, por ejemplo,

durante 12 horas o más; 18 horas o más; 24 horas o más; 36 horas o más; 48 horas o más; 60 horas o más; o 90 horas o más. En algunas modalidades, se necesitan periodos de incubación más prolongados para conseguir un fenotipo del endodermo anterior estable medido por la expresión prolongada de CDX2. En tales modalidades, los períodos de incubación pueden ser de 60 horas o más; 72 horas o más; 84 horas o más; 96 horas o más; 108 horas o más; 120 horas o más; 140 horas o más; 160 horas o más; 180 horas o más; 200 horas o más; 240 horas o más; o 300 horas o más.

Alternativamente, en algunas modalidades, la ausencia de constituyentes celulares, tales como marcadores del intestino posterior, tales como CDX2, puede usarse para revelar la formación dirigida del intestino anterior. En algunas modalidades, los factores de transcripción gástrica PDX1, KLF5 y SOX9 pueden usarse para representar el desarrollo gástrico. En algunas modalidades, la expresión de la proteína GATA4 y/o GATA6 puede usarse para representar el desarrollo gástrico. En estas modalidades, los períodos de incubación pueden ser de 12 horas o más; 18 horas o más; 24 horas o más; 36 horas o más; 48 horas o más; 60 horas o más; o 90 horas o más. Alternativamente, los períodos de incubación pueden ser de 60 horas o más; 72 horas o más; 84 horas o más; 96 horas o más; 108 horas o más; 120 horas o más; 140 horas o más; 160 horas o más; 180 horas o más; 200 horas o más; 240 horas o más; o 300 horas o más.

En algunas modalidades, los datos de abundancia de constituyentes celulares, por ejemplo, niveles de expresión de proteínas y/o genes, se determinan mediante inmunohistoquímica con el uso de anticuerpos primarios y/o secundarios que se dirigen a moléculas en las vías de señalización relevantes. En otras modalidades, los datos de abundancia de constituyentes celulares, por ejemplo, niveles de expresión de proteínas y/o genes, se determinan mediante análisis de micromatrices.

Alternativamente, también pueden usarse cambios morfológicos para representar el progreso de la diferenciación dirigida. En algunas modalidades, los esferoides del intestino anterior pueden someterse además a condiciones de cultivo tridimensionales para una maduración adicional. Además, los organoides gástricos pueden observarse en 6 días o más; 7 días o más; 9 días o más; 10 días o más; 12 días o más; 15 días o más; 20 días o más; 25 días o más; 28 días o más; 32 días o más; 36 días o más; 40 días o más; 45 días o más; 50 días o más; o 60 días o más.

Diferenciación dirigida de células madre pluripotentes

En algunas modalidades, las células madre pluripotentes se convierten en tipos de células gástricas mediante un proceso de "una etapa". Por ejemplo, una o más moléculas que pueden diferenciar las células madre pluripotentes en cultivo de DE (por ejemplo, Activina A) se combinan con moléculas adicionales que pueden promover la diferenciación dirigida del cultivo de DE (por ejemplo, activadores de Wnt3a/FGF4 e inhibidores de BMP) para tratar directamente las células madre pluripotentes.

Utilidades y kits

El tejido gástrico o los tipos de células relacionados obtenidos mediante los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para tamizar fármacos para captación gástrica y/o mecanismos de transporte y/o tratamiento de H.Pylori. Por ejemplo, esto puede hacerse de una manera de alto rendimiento para detectar los fármacos más efectivos o que se absorben más fácilmente, y puede aumentar los ensayos clínicos de Fase 1 que se realizan para estudiar la absorción gástrica y la toxicidad gástrica del fármaco. Esto puede incluir mecanismos de transporte pericelular e intracelular de moléculas pequeñas, péptidos, metabolitos, sales. Los tejidos gástricos obtenidos mediante los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse además para evaluar la compatibilidad con cualquier agente y/o dispositivo que esté destinado a entrar en contacto con los tejidos gástricos para evaluar la biocompatibilidad.

Puede usarse una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la presente descripción para identificar la base molecular del desarrollo gástrico humano normal.

Puede usarse una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la presente descripción para identificar la base molecular de defectos congénitos que afectan el desarrollo gástrico humano.

Puede usarse una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la presente descripción para corregir defectos congénitos gástricos causados por mutaciones genéticas. En particular, la mutación que afecta el desarrollo gástrico humano puede corregirse con el uso de tecnología iPSC y tejido gástrico genéticamente normal o tipos de células relacionadas obtenidos mediante los métodos descritos en la presente descripción. El tejido gástrico o los tipos de células relacionadas obtenidos mediante los métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para generar tejido de reemplazo. Los ejemplos de enfermedades genéticas incluyen, pero no se limitan a, mutaciones de Neurog3 y anendocrinosis entérica, mutaciones de PTFla y diabetes neonatal, mutaciones de PDX1 que afectan a las células enteroendocrinas del estómago.

Puede usarse una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la

presente descripción para generar tejido gástrico de reemplazo para enfermedades o afecciones tales como enfermedad de úlcera péptica, enfermedad de Ménétrier o para pacientes con cáncer gástrico.

5 Puede usarse una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la presente descripción para estudiar interacciones microbióticas con el epitelio del huésped humano y la inmunidad del huésped.

10 En algunas modalidades, el tejido gástrico o los tipos de células relacionadas obtenidos mediante los métodos descritos en la presente descripción, en particular las células enteroendocrinas, pueden usarse para estudiar la regulación hormonal del comportamiento de alimentación, metabolismo, mediado por endocrino gástrico.

15 Puede usarse una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la presente descripción, en particular las células enteroendocrinas que producen la hormona gastrina o grelina para estudiar y mejorar, por ejemplo, el control metabólico en pacientes con obesidad, síndrome metabólico o diabetes tipo 2.

Puede usarse una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la presente descripción para reemplazar cualquier tejido gástrico dañado o extirpado en un sujeto que lo necesite.

20 Puede usarse una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la presente descripción para tamizar la toxicidad y eficacia de cualquier fármaco que actúe sobre los tejidos gástricos.

25 Se usa una célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la presente descripción para determinar el nivel de absorción de un compuesto, el compuesto se pondrá en contacto con la célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico con un compuesto; y puede cuantificarse el nivel de absorción del compuesto por la célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico. En algunas modalidades, el compuesto puede marcarse con un radioisótopo, un marcador fluorescente o un marcador visible primario o secundario.

30 En la presente descripción se describe un kit o paquete de diagnóstico desarrollado para incluir la célula gástrica, tejido gástrico y/o hGO gástrico obtenido mediante los métodos descritos en la presente y en base a una o más de las utilidades mencionadas anteriormente.

35 Habiendo descrito la invención en detalle, resultará evidente que son posibles modificaciones, variaciones y modalidades equivalentes sin apartarse del alcance de la invención definida en las reivindicaciones adjuntas. Además, debe apreciarse que todos los ejemplos de la presente descripción se proporcionan como ejemplos no limitantes.

## EJEMPLOS

40 Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar aún más las modalidades de la invención descrita en la presente descripción. Los expertos en la técnica deben apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan enfoques que se ha encontrado que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, puede considerarse que constituyen ejemplos de modos para su práctica.

45 Cultivo de células madre pluripotentes

50 Las líneas de células madre embrionarias humanas WA01 (H1) y WA09 (H9) (solo ejemplo de referencia, no forma parte de la invención) se obtuvieron de WiCell. Las líneas ESC (solo ejemplo de referencia, no forma parte de la invención) y las líneas iPSC se mantuvieron como colonias en condiciones sin alimentador en Matrigel calificado para HESC (BD Biosciences) en medio mTesR1 (Stem Cell Technologies). Las células se subcultivaron de forma rutinaria cada cuatro días con dispasa (Invitrogen).

### Inducción de DE

55 (Resumido en la Figura 14). Se sembraron células ES humanas (solo ejemplo de referencia, no forma parte de la invención) y células iPS como células individuales en medio mTesR1 más inhibidor de ROCK Y27632 (10  $\mu$ M; Stemgent) en una placa de 24 pocillos recubierta con Matrigel (BD Biosciences) a 150 000 células por pocillo. El inhibidor de ROCK mejora la supervivencia de las células madre después del cultivo en placa para su diferenciación. A partir del día siguiente, las células se trataron con Activina A (100 ng ml<sup>-1</sup>; Cell Guidance Systems) durante tres días en RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía concentraciones crecientes de suero bovino fetal al 0 %, 0,2 % y 2,0 % (dFBS; Invitrogen).

### Diferenciación del endodermo definitivo (DE)

65 Para la diferenciación, las PSC se sembraron en placas como células individuales en una placa de 24 pocillos recubierta con Matrigel con el uso de accutase (Stem Cell Technologies), a una densidad de 150 000 células por

pocillo en mTesR1 con el inhibidor de ROCK Y-27632 (10  $\mu$ M; Stemgent). Al día siguiente, las CEP se diferenciaron a DE como se describió anteriormente<sup>11,35</sup>. Las células se expusieron a Activina A (100 ng ml<sup>-1</sup>; Cell Guidance Systems) durante tres días en medio RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía concentraciones crecientes de suero bovino fetal al 0 %, 0,2 % y 2,0 % (dFBS; Invitrogen). Además, se añadió BMP4 (50 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems) el primer día de inducción de DE.

#### Formación de patrones de endodermo y morfogénesis del tubo intestinal

Después de la inducción de DE, las células se trataron durante tres días con factores de crecimiento/antagonistas en RPMI 1640 con dFBS al 2,0 %. Para generar esferoides del intestino anterior posterior, se trató DE durante tres días con noggin (200 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems), FGF4 (500 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems) y WNT3A (500 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems) o CHIR99021 (2  $\mu$ M; Stemgent). CHIR99021 es una pequeña molécula que estimula la vía de señalización Wnt. Se añade RA (2  $\mu$ M; Sigma Aldrich) el último día. Crecimiento tridimensional y especificación antral. Los esferoides del intestino anterior posterior se incrustaron en Matrigel (BD Biosciences) como se describió anteriormente<sup>10,12</sup> y posteriormente se cultivaron en Advanced DMEM/F12 (Invitrogen) complementado con N2 (Invitrogen), B27 (Invitrogen), L-glutamina, HEPES 10  $\mu$ M, penicilina/estreptomicina y EGF (100 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems). Para la especificación antral, se añadieron RA y noggin durante los primeros tres días de crecimiento tridimensional. Para la especificación de células endocrinas, la concentración de EGF se reduce a 10 ng ml<sup>-1</sup> el día 30.

#### Formación de patrones de endodermo y generación de esferoides del intestino anterior

Después de la inducción de DE, las células se cultivaron en medio RPMI 1640 con dFBS al 2,0 % y factores de crecimiento: WNT3A (500 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems), CHIR99021 (2  $\mu$ M; Stemgent); FGF4 (500 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems) y Noggin (200 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems). Los medios se cambiaron todos los días. Después de tres días, la combinación de WNT3A (o CHIR99021), FGF4 y Noggin dio como resultado esferoides del intestino anterior flotantes en los pocillos de cultivo. Para posteriorizar el endodermo del intestino anterior, se añadió RA (2  $\mu$ M; Sigma Aldrich) en el tercer día del tratamiento con WNT/FGF/Noggin.

#### Cultivo tridimensional de organoides gástricos

Los esferoides se transfirieron a un sistema de cultivo in vitro tridimensional como se describió anteriormente<sup>5,10,12</sup>. Brevemente, se recolectaron los esferoides, se resuspendieron en 50  $\mu$ l de Matrigel (BD Biosciences) y se colocaron en placas en una gota tridimensional. Después de que se dejó solidificar Matrigel durante 10-15 minutos en una incubadora de cultivo de tejidos, los esferoides se superpusieron con medio intestinal: DMEM avanzado/F12 con N2 (Invitrogen), B27 (Invitrogen), L-glutamina, HEPES 10  $\mu$ M, penicilina/estreptomicina y EGF (100 ng ml<sup>-1</sup>; R&D Systems). Durante los primeros tres días, se añadieron RA y Noggin al medio intestinal. El medio se reemplazó cada 3-4 días, según fue necesario. El día 20, los organoides se recolectaron y se volvieron a sembrar en Matrigel fresco a una dilución de -1:12.

#### Generación de la línea hESC de hNEUROG3 inducible por dox (solo ejemplo de referencia; no forma parte de la invención)

Para generar el constructo de sobreexpresión, se clonó ADNc de hNEUROG3 (Dana-Farber/Harvard Cancer Center DNA Resource Core; clon HsCD00345898) en el vector lentiviral pInducer20 (obsequio de T. Westbrook<sup>36</sup>) con el uso de los métodos de Gateway Cloning (Invitrogen). El CCHMC Viral Vector Core produjo partículas lentivirales de alto título. Se disociaron las hESC de H1 (solo ejemplo de referencia, que no forma parte de la invención) con Accutase, se sembraron como una suspensión de células individuales en mTesR1 con Y-27632 10  $\mu$ M y se expusieron a lentivirus durante cuatro horas. El mTesR1 se reemplazó diariamente y después de dos días, se añadió G418 (200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) al medio para seleccionar los clones de integración. Las células resistentes a G418 se mantuvieron en antibiótico indefinidamente, pero por lo demás se cultivaron y subcultivaron normalmente.

#### Generación y caracterización de las líneas iPSC

Los fibroblastos primarios de prepucio humano (HFF) se cultivaron a partir de tejido de prepucio humano neonatal y se obtuvieron de 2 donantes a través del Departamento de Dermatología de la Universidad de Cincinnati, y fueron un amable obsequio de Susanne Wells PhD. Los HFF se cultivaron en medios de fibroblastos que consistían en DMEM (Invitrogen) complementado con FCS al 10 % (Hyclone) y se usaron para la reprogramación entre los subcultivos 5 y 8. Los plásmidos episomales basados en EBNA1/OriP pCLXE-hOct3/4-shp53, pCLXE-hSox2-Klf4, pCLXE-hLmyc-Lin28 y pCLXE-GFP usados para este estudio se describieron previamente<sup>37</sup> y se obtuvieron de Addgene (números de identificación: 27077, 27078, 27080 y 27082, respectivamente). Se usó el kit optimizado Human Dermal Fibroblast Nucleofector (VPD-1001; Lonza) para la transfección de HFF con plásmidos episomales. Brevemente, para cada transfección, se sedimentaron 1 x 10<sup>6</sup> HFF mediante centrifugación a 200xg durante 10 minutos a temperatura ambiente, se resuspendieron en 100 ml de solución Nucleofector a temperatura ambiente y se sometieron a nucleofección con 1,25  $\mu$ g de cada plásmido episomal (programa U20). Las células de 2 transfecciones (2 x 10<sup>6</sup> células en total) se volvieron a sembrar en una placa de cultivo de tejidos de 10 cm en medio de fibroblastos y se cultivaron a 37 °C/CO<sub>2</sub> al 5 %. Seis días después de la transfección, se volvieron a sembrar en

placa 4,5 x 105 HFF en medio de fibroblastos en una placa de 10 cm recubierta de gelatina que contenía 1,07 x 10<sup>6</sup> fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) irradiados. A partir del día 7 después de la transfección, las células se alimentaron diariamente con medio DMEM/F12 complementado con reemplazo de suero inactivo al 20 %, L-glutamina 1 mM, β-mercaptoetanol 0,1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM y 4 ng ml<sup>-1</sup> de FGF básico (todos de Invitrogen). Aproximadamente 2 semanas más tarde, colonias discretas con morfología similar a hESC se escindieron manualmente y se volvieron a sembrar en placa en medio mTeSR1 (Stem Cell Technologies) en placas de cultivo de tejidos recubiertas con matrigel calificado para hESC (Becton Dickinson). Después de la adaptación al cultivo de mTeSR1/matrigel, las iPSC que mantenían una proliferación robusta y una morfología similar a las de las hESC con una diferenciación espontánea mínima se expandieron para la criopreservación y caracterización.

El laboratorio de citogenética del CCHMC determinó las extensiones de metafase estándar y los cariotipos con bandas G. Para la formación de teratomas, se combinaron iPSC de 3 pocillos de una placa de 6 pocillos y se resuspendieron suavemente en DMEM/F12 helado. Inmediatamente antes de la inyección, se añadió matrigel a una concentración final de -33 % y las células se inyectaron por vía subcutánea en ratones NOD/SCID GAMMA C-/- inmunodeprimidos. Los tumores se formaron dentro de 6-12 semanas. Los teratomas extirpados se fijaron, se incluyeron en parafina y las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina para examen histológico.

#### Protocolo ilustrativo para organoide gástrico

La siguiente tabla ilustra un protocolo de tratamiento ilustrativo para el desarrollo de un organoide gástrico a partir de una célula precursora. \*\*Medio intestinal basal = Advanced DMEM/F12 + B27 + N2 + 1-glutamina + HEPES; mTeSR1 está disponible en StemCell Technologies.

Día	Medios	Tratamiento	Etapas de desarrollo/resultados
-1	mTeSR1	Y27632 (10 uM)	
0	RPMI	Activina A (100 ng/mL) + BMP4 (50 ng/mL)	HPSC monocapa (listas para diferenciarse)
1	RPMI + dFCS al 0,2 %	Activina A (100 ng/mL)	
2	RPMI + dFCS al 2,0 %	Activina A (100 ng/mL)	
3	RPMI + dFCS al 2,0 %	FGF4 (500 ng/mL) + Wnt3a (500 ng/mL) o CHIR99021 (2 uM)	Endodermo definitivo
4	RPMI + dFCS al 2,0 %	FGF4 (500 ng/mL) + Wnt3a (500 ng/mL) o CHIR99021 (2 uM)	
5	RPMI + dFCS al 2,0 %	RA (2 uM) + FGF4 (500 ng/mL) + Wnt3a (500 ng/mL) o CHIR99021 (2 uM)	
6	Medios intestinales basales	EGF (100 ng/mL) + RA (2 uM) + Noggin (200 ng/mL)	Esferoide del intestino anterior posterior en 3D
7	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/mL) + RA (2 uM) + Noggin (200 ng/mL)	
8	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/mL) + RA (2 uM) + Noggin (200 ng/mL)	
9	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml) + Noggin (200 ng/ml)	Presunto epitelio antral (Pdx1/Sox2)
10	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml) + Noggin (200 ng/ml)	
11	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml) + Noggin (200 ng/ml)	
12	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml) + Noggin (200 ng/ml)	
13	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
14	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
15	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
16	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
17	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
18	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	



(continuación)

	Día	Medios	Tratamiento	Etapas de desarrollo/resultados
5	19	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
	20	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
10	21	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
	22	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
	23	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
15	24	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
	25	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
20	26	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
	27	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
	28	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
25	29	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
	30	Medios intestinales basales**	EGF (100 ng/ml)	
30	31	Medios intestinales basales**	EGF (10 ng/ml)	
	32	Medios intestinales basales**	EGF (10 ng/ml)	
	33	Medios intestinales basales**	EGF (10 ng/ml)	
35	34	Medios intestinales basales**	EGF (10 ng/ml)	Organoides gástricos con tipos celulares diferenciados

## Protocolo de especificación de fondo

El solicitante primero buscó identificar genes expresados específicamente en el fondo, pero no en el antro, en las etapas embrionarias. Los tractos digestivos de los embriones de ratón E14.5 se micro-disecaron y se separaron en cuatro regiones: estómago (incluido el esófago), fondo, antro y duodeno. Ver la Figura 15. A continuación, estas regiones se analizaron mediante qPCR en busca de marcadores de regionalización. La Figura 15 muestra la expresión de genes de control que se sabe que se expresan en diferentes regiones. El fondo y el antro pueden distinguirse del preestómago y el duodeno por su alta expresión de Sox2 y Gata4, y la ausencia de P63 y Cdx2. Es importante destacar que Pdx1 (marcador del antro) se expresa a niveles mucho más altos en el tejido del antro que en el fondo, lo que indica una disección precisa.

Se usaron análisis bioinformáticos de conjuntos de datos de micromatrices publicados de endodermo de ratón embrionario y tejido de estómago humano adulto para generar una lista de genes candidatos que pueden expresarse preferentemente en el fondo pero no en el antro. La expresión de estos supuestos marcadores en los segmentos de ratón E14.5 se examinó mediante qPCR. Irx1, Irx2, Irx3, Irx5 y Pitx1 se expresan de hecho a niveles más altos en el fondo que en el antro. Por tanto, estos marcadores pueden usarse como indicadores de la especificación de fondo en los cultivos de intestino anterior derivados de hPSC. Ver la Figura 16.

A continuación, se probó la función de la señalización Wnt en la regulación de la formación de patrones de fondo-antro en los días 6-9 del protocolo de diferenciación de organoides gástricos. La adición de Wnt3a (a 100 ng/mL y 500 ng/mL) no tuvo ningún efecto sobre la expresión del gen de esferoide, pero también indujo la expresión del gen diana de Wnt Axin2. Por tanto, se probaron los efectos de la molécula pequeña CHIR99021 (CHIR; 2  $\mu$ M). CHIR99021 estimula la señalización Wnt de forma independiente del receptor. La exposición a CHIR dio como resultado una fuerte represión de los niveles de expresión de Pdx1, de acuerdo con la especificación de fondo. CHIR no indujo la expresión del marcador intestinal Cdx2. Ver la Figura 17. La Figura 18 muestra que, de acuerdo con la represión de Pdx1, la exposición a CHIR indujo altos niveles de expresión de marcadores específicos de fondo IRX3 e IRX5.

## H. infección por pylori

La cepa G2738 de *H. pylori* y una cepa G27 mutante que carece de CagA ( $\Delta$ CagA)<sup>39</sup> se cultivaron en placas de agar sangre que consistían en base de agar Columbia (Fisher Scientific), sangre de caballo al 5 % (Colorado Serum Company), 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>, vancomicina y 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de trimetoprima como se describió anteriormente <sup>40</sup>. Para las inyecciones de organoides, se resuspendieron *H. pylori* en caldo de brucella a una concentración de 1 x 10<sup>9</sup> bacterias ml<sup>-1</sup> y se cargaron en el aparato microinyector Nanoject II (Drummond). Se inyectaron aproximadamente 200 nl (que contenían 2 x 10<sup>5</sup> bacterias) directamente en el lumen de cada organoide, y los organoides inyectados se cultivaron durante 24 horas. Se inyectó caldo de Brucella como control negativo.

## Materiales y métodos

### Tinción inmunofluorescente

Todos los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante una hora a temperatura ambiente para el procesamiento congelado o durante la noche a 4 °C para el procesamiento en parafina. Para las secciones congeladas, el tejido se protegió en sacarosa al 30 % durante la noche a 4 °C, después se incrustó en OCT (Tissue-Tek) y se cortó a 10  $\mu$ m. Para las secciones de parafina, el tejido se procesó a través de una serie de etanol graduado, seguido de xileno, y después se incrustó en parafina y se cortó a 7  $\mu$ m. Las células de cultivo de tejidos se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron directamente. Para la tinción, los portaobjetos congelados se descongelaron a temperatura ambiente y se rehidrataron en PBS, mientras que los portaobjetos de parafina se desparafinaron y se sometieron a recuperación de antígeno. Los portaobjetos se bloquearon en suero de burro normal al 5 % (Jackson Immuno Research) en PBS más Triton-X al 0,5 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (enumerados en la Tabla de Métodos 1) se diluyeron en tampón de bloqueo y se incubaron durante la noche a 4 °C. Los portaobjetos se lavaron en PBS y se incubaron con anticuerpo secundario durante una hora a temperatura ambiente, y los cubreobjetos se montaron con el uso de Fluoromount-G (Southern Biotech). Las imágenes confocales se capturaron en un microscopio confocal invertido Nikon AIRSi.

### Aislamiento de ARN y qPCR

El ARN total se aisló de los tejidos con el uso del kit Nucleospin RNA II (Machery-Nagel). La transcripción inversa se realizó a partir de 100 ng de ARN con el uso del kit de síntesis de ADNc Superscript VILO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La qPCR se realizó con el uso de Quantitect SybrGreen Master Mix (Qiagen) en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX-96 (BioRad). El análisis se realizó mediante el método  $\Delta\Delta$ CT. Los cebadores de PCR se diseñaron con el uso de secuencias de qPrimerDepot (<http://primerdepot.nci.nih.gov>) y se enumeran en la Tabla 2.

### Análisis de inmunoprecipitación y de transferencia Western

Los organoides infectados con *H. pylori* se recolectaron de Matrigel en PBS helado y se centrifugaron a 150 g durante 5 minutos. El tejido se lisó en reactivo de extracto de proteína de mamífero M-PER (Thermo Scientific) complementado con inhibidores de proteasa (Roche). Se inmunoprecipitaron 10 mg de proteína total de los lisados celulares con anticuerpo anti-c-Met (2  $\mu$ g; Cell Signaling 4560) a 4 °C durante 16 horas. Después se añadieron perlas de agarosa de proteína A/G (20  $\mu$ l; Santa Cruz Biotechnology) y las muestras se incubaron a 4 °C durante 16 horas. Los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces en PBS y después se resuspendieron en tampón de carga Laemmli que contenía  $\beta$ -mercaptoetanol (40  $\mu$ l; BioRad). Las muestras se procesaron en un gel gradiente de Tris-Glicina al 4-20 % (Invitrogen) y se procesaron a 80 V durante 3,5 horas. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman Protran, 0,45  $\mu$ m) a 105 V durante 1,5 horas. Las membranas se bloquearon en solución de bloqueo de detector KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories) durante una hora a temperatura ambiente y después se incubaron con anticuerpo primario durante la noche a 4 °C. Anticuerpos primarios usados: anti-fosfotirosina (Santa Cruz, sc-7020; 1:100), anti-c-Met (Abcam, ab59884; 1:100) y anti-CagA de *H. pylori* (Abcam, ab90490; 1:100). Las membranas se lavaron e incubaron en anticuerpo secundario Alexa Fluor anti-ratón 680 (Invitrogen; 1:1000). Se obtuvieron imágenes de las transferencias con el uso del sistema de software de imágenes infrarrojas Odyssey (Licor).

## Discusión

Las hPSC se diferenciaron en endodermo definitivo (DE) <sup>11</sup>, que da lugar a los epitelios de los tractos gastrointestinal y respiratorio *in vivo*. Los siguientes dos eventos esenciales en el desarrollo de todos los órganos del endodermo son la formación de patrones de DE a lo largo del eje anterior-posterior (A-P) y la morfogénesis del tubo intestinal, lo que da como resultado la formación del intestino anterior Sox2+ en la parte anterior y el intestino posterior medio Cdx2+ en la parte posterior. (como se destaca en el embrión de ratón E8.5 en estadio de 14 somitas, Figura 1A). Esta morfogénesis y las interacciones tisulares entre el endodermo y el mesodermo parecen ser críticas para una organogénesis adecuada tanto *in vivo* como *in vitro*. Se ha demostrado previamente que WNT3A y FGF4 se sinergizan para hacer tres cosas: posteriorizar el DE derivado de hPSC, promover la expansión del mesénquima e inducir el ensamblaje de estructuras en forma de tubo intestinal que expresan el marcador CDX2<sup>10,12</sup>. La Figura 1A

muestra que la proteína Sox2 marca el endodermo del intestino anterior y la proteína Cdx2 marca el endodermo del intestino medio/posterior en embriones de ratón e8.5 (estadio de 14 somitas). La Figura 1B muestra que la inhibición de BMP reprimió el destino del intestino medio/posterior y promovió la expresión del marcador de intestino anterior SOX2. Análisis por PCR de marcadores de formación de patrones en cultivos de hPSC-DE expuestos a tres días en medio solo (control) o con los factores de crecimiento/antagonistas indicados. La actividad combinada de WNT y FGF indujo la expresión de CDX2 como se informó previamente<sup>10</sup> mientras que el antagonista de BMP noggin reprimió la expresión de CDX2 y fue suficiente para inducir niveles altos del marcador de intestino anterior SOX2. \*, p<0,05 en comparación con el control. \*\*, p<0,005 en comparación con WNT/FGF. La Figura 1C representa que los esferoides del intestino anterior generados con Wnt/FGF/Noggin tienen altos niveles de proteína SOX2 mediante tinción de inmunofluorescencia total y ARNm en comparación con los esferoides generados con Wnt y FGF solo, que tienen altos niveles de CDX2. \*, p<1,0x10<sup>-6</sup>. La Figura 1D representa que el intestino anterior posterior en un embrión de ratones e8.5 en estadio de 14-somitas da lugar al estómago y al páncreas y tiene niveles elevados de proteína Hnf1β. La Figura 1E representa que la exposición de cultivos a RA en el último día de la etapa de generación de esferoides induce la expresión de HNF1β en el epitelio que expresa SOX2, lo que da como resultado la formación de esferoides del intestino anterior posterior. \*, p<0,005. La Figura 1F representa un diagrama de linaje que resume los efectos de la formación de patrones de noggin y RA en la formación del endodermo del intestino anterior anterior y posterior. Barras de escala, 100 μm. Las barras de error representan la desviación estándar.

Tabla 1. Anticuerpos primarios.

Anticuerpo	Especie	Compañía	Ningún producto.	Dilución
alfa-SM-actina	conejo	GeneTex	GTX100034	1:200
aPKC	conejo	Santa Cruz	sc216	1:200
B-catenina	conejo	Santa Cruz	sc7199	1:100
Cdx2	ratón	Biogenex	MU392A-UC	1:500
ChrA	conejo	Immunostar	20086	1:500
Desmina	cabra	Santa Cruz	sc7559	1:200
E-Cadherina	ratón	BD Biosciences	610182	1:500
E-Cadherina	cabra	R&D Systems	AF648	1:500
FoxF1	cabra	R&D Systems	AF4798	1:500
Gastrina	conejo	Dako	A0568	1:1000
Gata4	ratón	Santa Cruz	sc25310	1:200
Grelina	cabra	Santa Cruz	sc10368	1:200
H. pylori	conejo	Abcam	ab80519	1:1000
HnflB	ratón	BD Biosciences	612504	1:500
HnflB	cabra	Santa Cruz	sc4711	1:500
Ki67	conejo	Abcam	ab833	1:200
Ki67	rata	Dako	m7249	1:100
Klf5	rata	Dr. Ryozi Nagai	Shindo y otros, 20021: 2000	
Muc5AC	ratón	Abcam	ab3649	1:500
Nanog	conejo	Abcam	ab21624	1:500
Oct3/4	ratón	Santa Cruz	sc5279	1:500
Pdx1	cabra	Abcam	ab47383	1:5000
pHH3	conejo	Señalización celular	9701	1:500
Serotonina (5-HT)	conejo	Immunostar	20080	1:1000
Somatostatina	cabra	Santa Cruz	sc7819	1:100
Sox2	cabra	Santa Cruz	sc17320	1:500
Sox2	conejo	Seven Hills Bioreagents	WRAB-1236	1:1000
Tff2	cabra	Santa Cruz	sc23558	1:500
Vimentina	cabra	Santa Cruz	sc7557	1:200

Tabla 2. Secuencias de cebadores de qPCR.

Diana (humana)	Cebador directo	Cebador inverso
ATP4A	TGGTAGTAGCCAAAGCAGCC	TGCCATCCAGGCTAGTGAG
ATP4B	ACCACGTAGAAGGCCACGTA	TGGAGGAGTTCCAGCGTTAC
AXIN2	CTGGTGCAAAGACATAGCCA	AGTGTGAGGTCCACGGAAAC
BAPX1	CAACACCGTCGTCTCTCG	CCGCTTCCAAAGACCTAGAG
CDX2	CTGGAGCTGGAGAAGGAGTTTC	ATTTTAACCTGCCTCTCAGAGAGC
CHGA	TGACCTCAACGATGCATTTTC	CTGTCCTGGCTCTTCTGCTC
GAPDH	CCCATCACCATCTTCCAGGAG	CTTCTCCATGGTGGTGAAGACG
GAST	CAGAGCCAGTGCAAAGATCA	AGAGACCTGAGAGGCACCAG
GATA4	TCCAAACCAGAAAACGGAAGC	GCCCGTAGTGAGATGACAGG
GHRL	GCTGGTACTGAACCCCTGAC	GATGGAGGTCAAGCAGAAGG
GKN1	AGCTAGGGCAGGAGCTAGAAA	GCTTGCCTACTCCTCTGTCC
HNF1B	TCACAGATACCAGCAGCATCAGT	GGGCATCACCAGGCTTGTA
HNF6	TGTTGCCTCTATCCTTCCCA	GGAGGATGTGGAAGTGGCT
IRX1	CCGTAGGGGTAATAAGCCG	ATCTCAGCCTCTTCTCGCAG
IRX2	GTGGTGTGCGCGTCGTA	GGCGTTCAGCCCTACC
IRX3	GGAGAGAGCCGATAAGACCA	AGTGCCTTGAAGTGGAGAA
IRX5	GGTGTGTGGTCGTAGGGAGA	GCTACAACCTCGCACCTCCA
MIST1	TGCTGGACATGGTCAGGAT	CGGACAAGAAGCTCTCCAAG
MSX1	GGTTCGTCTTGTGTTTGCG	CCCGAGAAGCCCGAGAG
MSX2	GGTCTTGTGTTTCCTCAGGG	AAATTCAGAAGATGGAGCGG
MUC2	TGTAGGCATCGCTCTTCTCA	GACACCATCTACCTACCCG
MUC5AC	CCAAGGAGAACCTCCCATAT	CCAAGCGTCATTCTGAG
MUC6	CAGCAGGAGGAGATCACGTTCAAG	GTGGGTGTTTTCTGTCTGTCATC
NEUROG3	CTTCGTCTTCCGAGGCTCT	CTATTCTTTTGCGCCGGTAG
PDX1	CGTCCGCTTGTTCTCCTC	CCTTTCCCATGGATGAAGTC
PITX1	TTCTTGCTGGGTGCTCT	TCGTCTGACACGGAGCTG
PTF1a	AGAGAGTGTCTGCTAGGGG	CCAGAAGGTCATCATCTGCC
SST	GCGCTGTCCATCGTCTGGCCC	AGCCGGGTTTGAGTTAGCAGAT
SOX2	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC	AACCCCAAGATGCACAACCTC
TFF1	AATTCTGTCTTTCACGGGGG	GGAGAACAAGGTGATCTGCG
TFF2	TCTGAGACCTCCATGACGC	ATGGATGCTGTTTCGACTCC
TFF3	CACTCCTTGGGGGTGACA	CTCCAGCTCTGCTGAGGAGT

Para promover la formación de estructuras del intestino anterior en el DE derivado de hPSC, el solicitante buscó separar la capacidad de WNT/FGF para estimular la morfogénesis del tubo intestinal de su papel en la promoción de un destino de endodermo posterior. Basándose en estudios *in vivo* de organismos modelo de desarrollo<sup>13,14</sup>, se probó la función de la señalización de BMP en la regulación de la formación de patrones de AP y el solicitante determinó que WNT/FGF requiere actividad de BMP para iniciar el programa del intestino posterior. Específicamente, la inhibición de la señalización de BMP con el antagonista Noggin reprimió CDX2 e indujo el marcador de intestino anterior SOX2 en cultivos de DE después de tres días, incluso en presencia de WNT/FGF (Figuras 1B-C y Figura 5). Es importante destacar que la inhibición de la señalización de BMP no tuvo ningún efecto sobre la capacidad de WNT/FGF para promover la expansión del mesénquima y el ensamblaje de las estructuras del tubo intestinal, lo que dio como resultado la formación de esferoides del intestino anterior SOX2<sup>+</sup>.

La Figura 5 muestra que la señalización de BMP se requiere en paralelo con la activación de WNT y FGF para promover un destino posterior. La Figura 5A muestra que el inhibidor de GSK3 $\beta$  CHIR99021 (CHIR; 2  $\mu$ M) indujo los mismos efectos de posteriorización que el WNT3A recombinante y estos pueden bloquearse mediante la inhibición de BMP. La Figura 5B muestra que la morfogénesis del tubo intestinal inducida por CHIR y la producción de esferoides ocurren de una manera similar a WNT3A. La Figura 5C representa la tinción inmunofluorescente de

cultivos en monocapa que confirma la alta eficacia de la inducción de CDX2 en el endodermo tratado con CHIR/FGF y la inducción de SOX2 en el endodermo tratado con noggin y con CHIR/FGF/noggin. La Figura 5D muestra el análisis de qPCR de genes diana de BMP MSX1/2, lo que indica que la actividad de BMP no aumenta en respuesta a Wnt/FGF, pero los genes diana se suprimen en respuesta a noggin, lo que demuestra la presencia de señalización de BMP endógena. La Figura 5E muestra que la adición de BMP2 (100 ng mL<sup>-1</sup>) no sustituyó ni aumentó la capacidad de Wnt/FGF para posteriorizar el endodermo. Estos datos indican que el efecto posteriorizante de Wnt/FGF no está mediado por la regulación positiva de la señalización de BMP, pero requiere actividad de BMP endógena. Barras de escala, 1 mm en la figura 5B; 100 µm en la Figura 5C. Las barras de error representan la desviación estándar.

La morfogénesis de esferoide es un proceso robusto tanto en las líneas hESC (solo ejemplo de referencia, no forma parte de la invención) como en las líneas hiPSC (Figura 6A) y >90 % de las células esferoides expresan SOX2 (Figura 1C), lo que indica una especificación eficiente en el linaje del intestino anterior. Por lo tanto, el solicitante ha identificado una nueva relación epistática entre WNT, FGF y BMP en la que las tres vías cooperan para promover un destino del intestino posterior medio, mientras que WNT y FGF actúan por separado de BMP para impulsar el ensamblaje de endodermo y mesodermo en las estructuras del tubo intestinal.

Las Figuras 2A-2G muestran que la diferenciación organoide gástrica es un proceso eficiente e independiente de la línea celular. Figura 2A, Tabla que compara la formación de esferoides y las características entre dos líneas de hESC (H1 y H9; (solo ejemplo de referencia, no forma parte de la invención)) y una línea de iPSC (72.3). Figura 2B, tinción inmunofluorescente de hGO del día 34 derivados de las líneas celulares H1 e iPSC 72.3. Los organoides derivados de iPSC exhiben las mismas características morfológicas y moleculares que los derivados de hESC (solo ejemplo de referencia, no forma parte de la invención). Figura 2C. Cuantificación del tipo de células epiteliales de órganos en hGO del día 34. Más del 90 % del epitelio es antral, indicado por la expresión de PDX1 y la falta de expresión de PTF1A, mientras que menos del 5 % expresa marcadores asociados con otros órganos derivados del endodermo incluidos CDX2 (intestino), albúmina (hígado) y p63 (epitelio escamoso). d-g, Caracterización de la línea de células madre pluripotentes inducidas iPSC 72.3. Figura 2D, iPSC 72.3 exhibe características morfológicas normales de colonias de células madre pluripotentes, en comparación con la línea H1 hESC (solo ejemplo de referencia - no forma parte de la invención) y Figura 2E, tiene un cariotipo 46;XY normal. Figura 2F, iPSC 72.3 expresa marcadores pluripotentes OCT3/4 y NANOG, y Figura 2G, demuestra pluripotencia por diferenciación en linajes de endodermo, mesodermo y ectodermo en un ensayo de teratoma in vivo. Barras de escala, 100 µm. Las barras de error representan la desviación estándar.

*In vivo*, los dominios fúndico y antral del estómago surgen del segmento posterior del endodermo del intestino anterior Sox2+, junto con el páncreas, el hígado y el duodeno. Para dirigir los esferoides del intestino anterior SOX2+ al linaje gástrico, el solicitante buscó identificar las vías de señalización que promueven el destino de intestino anterior posterior. El solicitante se centró en la señalización de ácido retinoico (RA) dado su papel en el desarrollo de órganos derivados del intestino anterior posterior.<sup>15-17</sup> *In vivo*, el intestino anterior posterior está marcado por la expresión de Hnf1β (Figura 1D). El solicitante identificó que una exposición de 24 horas a RA en el último día (días 5-6) de la etapa de formación de patrones/esferoides (FGF4/WNT3A/Noggin) da como resultado una activación robusta de los marcadores del intestino anterior posterior y la formación de esferoides del intestino anterior posterior SOX2/HNF1β+ (Figura 1E y Figura 7). Por lo tanto, la manipulación temporal y combinatoria precisa de las vías de señalización de RA, WNT, FGF y BMP permitió la generación de esferoides tridimensionales del intestino anterior posterior.

Las Figuras 7A-7D muestran que el ácido retinoico posterioriza el endodermo del intestino anterior. La Figura 7A representa una ilustración esquemática de experimentos de formación de patrones del intestino anterior. Los cultivos de DE se trataron con Wnt(CHIR)/FGF/noggin durante tres días para generar esferoides del intestino anterior positivos para Sox2, y se añadió RA durante 24 horas al tercer día de formación de patrones. La Figura 7B representa imágenes de campo claro que muestran que RA aumenta el número de esferoides que se producen a partir de cultivos en monocapa del intestino anterior. La Figura 7C representa una imagen de menor aumento de la Figura 1D que muestra una imagen inmunofluorescente de un embrión en estadio de 14 somitas con la proteína Hnf1β localizada en la porción posterior del intestino anterior. En la Figura 1D se muestra la región en caja del embrión. La Figura 7D muestra el análisis de qPCR de la expresión génica en esferoides del intestino anterior tratados con RA. Los marcadores del intestino anterior posterior HNF1β y HNF6 se inducen de manera robusta mediante la exposición de 24 horas al RA. \*, p<0,05. Barras de escala, 1 mm en la figura 7B; 100 µm en la Figura 7C. Las barras de error representan la desviación estándar.

Los mecanismos moleculares que dirigen el intestino anterior posterior hacia distintos linajes de órganos son poco conocidos. Al principio del desarrollo, los dominios de órganos presuntos están marcados por patrones de expresión génica distintos: Sox2+ fúndico, Sox2/Pdx1+ antro, Pdx1/Ptf1α+ páncreas y Pdx1/Cdx2+ duodeno (Figura 2B). El solicitante usó estos marcadores moleculares para identificar las vías de señalización que dirigen los cultivos de esferoides del intestino anterior posterior al linaje gástrico. Después de la transferencia de esferoides a condiciones de cultivo tridimensionales, el tratamiento adicional con RA durante 72 horas (días 6-9) provocó un aumento >100 veces en los niveles de ARNm de PDX1 mientras se mantenía una alta expresión de SOX2 (Figura 2C). Es importante destacar que el tratamiento con RA no promovió un destino pancreático como lo observaron otros<sup>9</sup>, ya

que no se indujo la expresión del marcador específico del páncreas *PTF1a*. Estos datos demuestran que la combinación de señalización de RA con crecimiento tridimensional dirige eficientemente los esferoides del intestino anterior posterior hacia un epitelio SOX2/PDX1<sup>+</sup> indicativo de un destino de antro temprano.

La Figura 2 representa en general la especificación y el crecimiento de organoides gástricos antrales humanos. Las barras de error representan la desviación estándar. La Figura 2A muestra una representación esquemática del sistema de cultivo *in vitro* usado para dirigir la diferenciación de las hPSC en organoides gástricos tridimensionales, la Figura 2B muestra los marcadores definidos de los órganos del intestino anterior posterior en desarrollo mediante tinción inmunofluorescente total de embriones de ratón E10.5 con Sox2, Pdx1 y Cdx2. La coexpresión de Sox2 y Pdx1 es exclusiva de la porción distal del epitelio gástrico, el presunto antro (a), la expresión de Sox2 marca el fondo (f), la expresión de Pdx1 (y Ptf1a) marca el páncreas dorsal (dp) y ventral (vp), y la coexpresión de Pdx1/Cdx2 marca el duodeno (d). La FIG2C muestra que los esferoides del intestino anterior posterior cultivados en matriz tridimensional durante tres días en presencia de RA (2  $\mu$ M) coexpresaron niveles altos de PDX1 y SOX2 y no expresaron el marcador pancreático PTF1a, similar al antro en desarrollo\*,  $p < 0,05$ . La Figura 2D representa estereomicrografías que muestran cambios morfológicos durante el crecimiento de esferoides del intestino anterior posterior en organoides gástricos. A las cuatro semanas, el epitelio de los hGO exhibía una arquitectura glandular compleja, barra de escala, 500  $\mu$ m. La Figura 2E representa una comparación del antro de ratón en desarrollo en E14.5 y E18.5 y etapas comparables de desarrollo de hGO. Sox2 y Pdx1 se coexpresan en los primeros epitelios pseudoestratificados tanto en el antro del ratón como en los hGO. En etapas posteriores, Sox2 se regula negativamente a medida que los epitelios se transforman en estructuras glandulares más maduras. Pdx1 se mantiene en el antro durante la edad adulta *in vivo* y en todas las etapas examinadas en los hGO, barras de escala de 100  $\mu$ m en FIG2E.

El solicitante usó esferoides SOX2/PDX1<sup>+</sup> para identificar vías que promueven el crecimiento y la morfogénesis del epitelio gástrico temprano y encontró que altas concentraciones de EGF (100 ng mL<sup>-1</sup>) eran suficientes para promover el crecimiento robusto de organoides gástricos antrales humanos (hGO). En el transcurso de 3-4 semanas, los esferoides de <100  $\mu$ m de diámetro se convirtieron en organoides de 2-4 mm de diámetro. En las últimas etapas del cultivo (~ día 27), el epitelio de hGO experimentó una serie de cambios morfogénéticos que recuerdan las etapas tardías del desarrollo gástrico embrionario, durante las cuales un epitelio pseudoestratificado simple y plano se transforma en un epitelio glandular elaborado y complicado (Figura 2D). El crecimiento inicial de los esferoides del intestino anterior depende de EGF (datos no mostrados); además, la expansión epitelial y la morfogénesis hacia las glándulas no se produce cuando el EGF se elimina del medio el día 27 (Figura 8). Estos resultados apoyan los hallazgos publicados que indican un papel importante del EGF en la promoción del crecimiento adecuado de la mucosa gástrica<sup>19,20</sup>.

La Figura 8 muestra que se requiere EGF para la morfogénesis glandular en organoides gástricos. Las imágenes de campo claro y la inmunotinción demuestran el requisito de EGF para la morfogénesis epitelial y la formación de glándulas en las últimas etapas de la diferenciación de hGO. Cuando el EGF se elimina del medio de crecimiento el día 27, antes de la morfogénesis glandular, el epitelio de hGO mantiene una estructura cuboidal simple que no puede formar glándulas. Barras de escala, 100  $\mu$ m.

Una comparación del crecimiento de hGO con el desarrollo del estómago de un ratón embrionario reveló que el desarrollo de hGO es sorprendentemente similar a la organogénesis del estómago *in vivo*. En las primeras etapas (E12-14 en ratón y hGO de 13 días), ambos epitelios están pseudoestratificados y contienen células mitóticas que se concentran hacia la cara luminal (Figura 9 y Figura 10), lo que indica un proceso de migración nuclear intercinética<sup>21</sup>. Los primeros hGO están apropiadamente polarizados y contienen lúmenes secundarios que están delineados por la expresión del marcador apical aPKC<sup>22</sup> (Figura 10).

Entre E16.5 y las etapas posnatales tempranas, el antro se transforma en un epitelio columnar simple que exhibe una organización altamente estructurada que consiste en glándulas y fosas (Figura 2E y Figura 9). Entre 13 y 34 días *in vitro*, el epitelio de hGO experimenta transiciones similares para formar un epitelio columnar alto con una estructura glandular similar al antro fetal tardío (Figura 2E). El análisis de la expresión de los factores de transcripción Sox2, Pdx1, Gata4 y Klf5 reveló un patrón de expresión temporoespacial estereotipado que acompaña a estos procesos morfogénéticos tanto *in vivo* como *in vitro* (Figura 9). En las primeras etapas, todos estos factores se coexpresan en el epitelio pseudoestratificado inmaduro. Sin embargo, en etapas posteriores, la expresión de Sox2 se regula negativamente a medida que el epitelio forma glándulas y fosas tempranas, mientras que la expresión de los otros factores se mantiene indefinidamente. Con base en estos datos, se estima que los hGO de 13 días representan una etapa de desarrollo similar al antro del ratón E12-14, mientras que los hGO de 34 días son más comparables al antro fetal tardío-postnatal temprano. Además, se concluye que los hGO recapitulan el desarrollo embrionario normal y que los procesos moleculares y morfogénéticos que se producen durante el desarrollo del antro se conservan entre roedores y humanos.

La Figura 9 muestra una comparación de la expresión del factor de transcripción durante el desarrollo del antro del ratón y los organoides gástricos humanos. Se analizaron cuatro etapas embrionarias (E12.5, E14.5, E16.5 y E18.5) y una etapa postnatal (P12) del desarrollo del antro *in vivo* para determinar la expresión del factor de transcripción: Sox2, Pdx1, Gata4, Klf5 y FoxF1. Los mismos marcadores se analizaron en dos etapas (13 días y 34 días) del

desarrollo de hGO *in vitro* y revelaron que el desarrollo de organoides es paralelo a lo que se produce *in vivo*. En las primeras etapas del desarrollo del antro, el marcador epitelial Sox2 se expresa de manera ubicua, pero en etapas posteriores está regulado negativamente, mientras que otros factores de transcripción epitelial, Pdx1, Gata4 y Klf5, exhiben una expresión persistente durante todo el desarrollo. Tanto los hGO en etapa temprana como tardía contienen células mesenquimales positivas para FoxF1 que rodean el epitelio. Barras de escala, 100 µm. La Figura 10 muestra que los organoides gástricos humanos en etapa temprana exhiben una arquitectura estereotipada y un comportamiento nuclear. A los 13 días, los hGO contienen epitelios pseudoestratificados que muestran polaridad apicobasal marcada por el marcador apical aPKC y el marcador basolateral E-Cadherina, similar al antro de ratón E12.5. Además, los lúmenes secundarios revestidos por una membrana apical (flechas blancas) se ven dentro del epitelio organoide. Tanto el antro de ratón E12.5 como los hGO del día 7 parecen experimentar una migración nuclear intercinética, indicada por la presencia de núcleos mitóticos, pHH3, sólo en las porciones apicales de las células. Barras de escala, 50 µm.

Los esferoides del intestino anterior contenían un componente de mesénquima similar a los esferoides del intestino posterior medio que se describieron previamente<sup>10</sup>. Durante la diferenciación en organoides gástricos, el mesénquima se expande y expresa factores de transcripción clave asociados con el desarrollo del mesénquima antral, incluidos FOXF1 y BAPX1 (Figura 10 y Figura 11). En etapas posteriores, el mesénquima de hGO consiste principalmente en fibroblastos submucosos de VIMENTIN<sup>+</sup> y un número menor de miofibroblastos subepiteliales de ACTA2<sup>+</sup> (Figura 11), indicativo de mesénquima gástrico inmaduro. Los hGO no forman capas diferenciadas de músculo liso como se produce *in vivo*. Dado que existe una morfogénesis epitelial tan robusta en ausencia de factores exógenos excepto EGF, parece probable que el mesénquima desempeñe un papel en el desarrollo epitelial. Por tanto, es sorprendente que el epitelio no parezca promover una diferenciación robusta del mesénquima. Esto sugiere que otros estímulos, posiblemente mecánicos, juegan un papel en la diferenciación del mesénquima gástrico.

La Figura 11 muestra la diferenciación mesenquimatosas en organoides gástricos. La Figura 11A muestra el análisis de expresión temporal del factor de transcripción del mesénquima antral BAPX1. Similar a su patrón de expresión embrionario conocido, BAPX1 se regula positivamente durante las primeras etapas de la diferenciación de hGO y después se regula negativamente coincidiendo con la expresión del marcador de tipo celular funcional. La Figura 11B muestra que la tinción para marcadores de tipo de células mesenquimales revela que los hGO del día 34 contienen fibroblastos submucosos positivos para FOXF1/VIMENTIN y un pequeño número de fibroblastos subepiteliales que expresan VIMENTIN/ALPHA-SM-ACTIN (SMA). Los hGO carecen de una capa robusta de músculo liso, indicado por células positivas para SMA/Desmina en el antro *in vivo*. Barras de escala, 100 µm. Las barras de error representan la desviación estándar.

Los principales tipos de células funcionales que se encuentran en el antro son las células mucosas, que secretan las capas mucosas protectoras que recubren el epitelio gástrico, y las células endocrinas que secretan hormonas para regular la fisiología gastrointestinal y la homeostasis metabólica<sup>24</sup>. Para el día 34, los hGO contienen células mucosas superficiales (MUC5AC/UEAI<sup>+</sup>) que secretan moco en el lumen y tienen la misma morfología columnar alta que su contraparte *in vivo*. Los hGO también contienen células de la glándula antral TFF2/GSII<sup>+</sup>, lo que indica una diferenciación apropiada en los linajes mucosos antrales (Figura 3A). Además, los hGO desarrollan un nicho de células progenitoras, indicado por zonas de proliferación y expresión de SOX9 localizadas basalmente (Figura 4A), aunque el índice de proliferación del epitelio es variable y oscila entre el 1-10 %. Por tanto, los hGO *in vitro* contienen un epitelio gástrico fisiológico que comprende tantos tipos de células progenitoras como diferenciadas.

La Figura 4 muestra que los organoides gástricos humanos exhiben respuestas agudas a la infección por *H. pylori*. La Figura 4A muestra que los hGO del día 28 contenían células proliferativas, marcadas por Ki67, y células progenitoras SOX9<sup>+</sup> que estaban restringidas hacia la parte inferior de las glándulas tempranas, de forma similar al antro embrionario tardío y postnatal de ratón. La Figura 4B muestra que se usaron hGO para modelar procesos patológicos específicos de humanos de la infección por *H. pylori*. Las bacterias se microinyectaron en el lumen de los hGO y las bacterias se visualizaron en el lumen 24 horas después de la inyección mediante microscopía de campo claro (flecha negra) y tinción inmunofluorescente. La Figura 4C representa la inmunoprecipitación para el oncogén c-Met y demuestra que *H. pylori* indujo una activación robusta (fosforilación de tirosina) de c-Met, y que este es un proceso dependiente de CagA. Además, CagA interactúa directamente con c-Met en células epiteliales gástricas humanas. La Figura 4D muestra que en 24 horas, la infección por *H. pylori* provocó un aumento de dos veces en el número de células proliferantes en el epitelio de hGO, medido por la incorporación de EdU. \*, p<0,05. Barras de escala, 100 µm en a; 25 µm en b. Las barras de error representan s.e.m.

La Figura 3 demuestra que los organoides gástricos humanos contienen tipos de células antrales diferenciadas normales y pueden usarse para modelar el desarrollo del estómago humano. La Figura 3A demuestra que los hGO contienen todos los principales linajes de células antrales. Los hGO de 34 días tienen células mucosas superficiales (Muc5AC) y células de las glándulas mucosas (TFF2), así como también tinción de lectina que distingue las células mucosas superficiales, UEAI y de las glándulas mucosas, GSII. Los hGO también contienen células endocrinas marcadas por Cromogranina A (CHGA). La Figura 3B es una representación esquemática de las diferentes funciones del EGF en el crecimiento, la morfogénesis y la especificación del tipo de célula durante el desarrollo de hGO. Se requirieron altos niveles de EGF en las primeras etapas del desarrollo para la formación de la glándula, sin

embargo, reprimió la diferenciación endocrina en las últimas etapas del desarrollo; por lo tanto, la concentración de EGF se redujo el día 30 para permitir el desarrollo de células endocrinas. La Figura 3C muestra que todas las hormonas endocrinas principales se expresan en los hGO tras la retirada de EGF, incluidas gastrina, grelina y serotonina (5-HT). La Figura 3D muestra que niveles altos de EGF reprimen la expresión de NEUROG3. Una reducción en la concentración de EGF en el día 30 dio como resultado un aumento significativo en la expresión de NEUROG3 medida en el día 34 por qPCR, lo que indica que EGF actúa corriente arriba de NEUROG3 en la especificación endocrina. \*,  $p < 0,05$ . La Figura 3E muestra que NEUROG3 actúa corriente abajo de EGF para inducir el destino de células endocrinas. La expresión forzada de NEUROG3 con el uso de un sistema inducible por dox era suficiente para anular los efectos de represión endocrina de EGF a alto nivel (100 ng mL<sup>-1</sup>). Los hGO se expusieron a dox (1 µg mL<sup>-1</sup>) durante 24 horas el día 30 y se analizaron el día 34. Los organoides tratados con Dox exhibieron una fuerte inducción de células endocrinas que expresan ChrA. Barras de escala, 100 µm. Las barras de error representan la desviación estándar.

También hay una abundancia de células endocrinas de CROMOGRANINA-A (CHGA)<sup>+</sup> en los hGO de 34 días, incluidos los cuatro tipos principales de células endocrinas en el antro que expresan gastrina, grelina, somatostatina y serotonina (Figura 3C y Figura 12). Curiosamente, observamos que los altos niveles de EGF reprimen la formación de células endocrinas, de modo que 100 ng mL<sup>-1</sup> dan como resultado <1 célula endocrina por organoide. Por el contrario, los hGO cultivados en niveles más bajos de EGF (10 ng mL<sup>-1</sup>) desde el día 30-34 desarrollaron una abundancia de células endocrinas (Figura 13). Además, un EGF elevado también inhibió la expresión del factor de transcripción proendocrino NEUROG3 (Figura 3D), que ha sido ampliamente estudiado en el páncreas y el intestino<sup>25-28</sup> y es necesario en la formación de la mayoría de los linajes endocrinos gástricos<sup>29,30</sup>. Estos datos sugieren un nuevo efecto inhibidor de la señalización de EGFR en la especificación de células endocrinas gástricas corriente arriba de NEUROG3. Para probar este modelo, el solicitante usó una línea de hESC de sobreexpresión de hNEUROG3 inducible por doxiciclina (solo ejemplo de referencia, no forma parte de la invención), y encontró que la expresión de NEUROG3 era suficiente para superar el efecto inhibidor endocrino de EGF a alto nivel (100 ng mL<sup>-1</sup>), lo que da como resultado una sólida formación de células endocrinas CHGA<sup>+</sup> (Figura 3E y Figura 13). A partir de estos hallazgos, se llegó a la conclusión de que EGF inhibe la formación de células progenitoras endocrinas mediante la represión de NEUROG3, y que NEUROG3 es suficiente para la especificación de células endocrinas gástricas humanas.

La Figura 12 muestra el desarrollo de células endocrinas del antro gástrico *in vivo*. La diferenciación de células endocrinas en el antro es evidente por primera vez en E18.5, pero es más definitiva en las etapas posnatales (se muestra P12). En las primeras etapas, todos los subtipos endocrinos gástricos esperados son evidentes, incluidos gastrina, grelina, somatostatina y serotonina (5-HT). Barras de escala, 100 µm. La Figura 13 muestra que la señalización de EGF reprime un programa de especificación endocrina gástrica dependiente de NEUROG3. La Figura 13A muestra que los hGO mantenidos en altas concentraciones de EGF (100 ng mL<sup>-1</sup>) tenían muy pocas células endocrinas en el día 34, mostrado por tinción para el marcador pan-endocrino CHGA. Una reducción de la concentración de EGF (10 ng mL<sup>-1</sup>) el día 24 dio como resultado un mayor número fisiológico de células endocrinas en el epitelio gástrico. La Figura 13B muestra la generación de hGO a partir de una línea de hESC transfectada de manera estable con un transgén que sobreexpresa NEUROG3 inducible por dox (solo ejemplo de referencia, no forma parte de la invención), para probar si la represión de EGF de la diferenciación endocrina se produce corriente arriba de NEUROG3. Los hGO se mantuvieron en EGF a alto nivel (100 ng mL<sup>-1</sup>) y después en el día 30 se trataron con doxiciclina (1 mg mL<sup>-1</sup>) durante 24 horas y después se analizaron el día 34. Los hGO tratados con Dox muestran una fuerte activación de los marcadores endocrinos CHGA, GASTRINA, GHRELINA y SOMATOSTATINA, y contienen células positivas para CHGA (Figura 3A), GHRELINA y SOMATOSTATINA con morfología endocrina. \*,  $p < 0,05$ . Barras de escala, 100 µm. Las barras de error representan la desviación estándar.

La evidencia clínica indica que la colonización predominante del antro tiene un papel importante en la enfermedad mediada por *H. pylori*<sup>31,32</sup>. Por tanto, el solicitante probó si los hGO podrían usarse para modelar la respuesta patofisiológica del estómago humano al patógeno *H. pylori*. Para imitar la interfaz normal huésped-patógeno, se introdujo *H. pylori* directamente en la superficie luminal del epitelio mediante microinyección en el lumen de los organoides y se midió la señalización y la proliferación del epitelio (Figura 4). Se observaron bacterias estrechamente asociadas con el epitelio de hGO mediante inmunofluorescencia (Figura 4B). En 24 horas, el solicitante observó respuestas epiteliales significativas a *H. pylori*, incluida la activación robusta del oncogén gástrico c-Met<sup>33</sup> y un aumento de 2 veces en la proliferación de células epiteliales. El factor de virulencia de *H. pylori* CagA juega un papel fundamental en la etiología de la enfermedad. De acuerdo con los estudios publicados<sup>34</sup>, el solicitante demostró que CagA se transloca en las células epiteliales organoides y forma un complejo con c-Met (Figura 4C). Además, la respuesta epitelial se anuló cuando los hGO se inyectaron con una cepa no patógena de *H. pylori* que carece de CagA, lo que refuerza la importancia de este factor en la patogénesis humana mediada por *H. pylori*. Por lo tanto, la respuesta fisiopatológica de los hGO a *H. pylori* los convierte en un modelo sin precedentes para dilucidar los eventos iniciadores de la enfermedad gástrica humana mediada por *H. pylori*.

#### Referencias adicionales

1. Wen, S. & Moss, S. F. Helicobacter pylori virulence factors in gastric carcinogenesis. Cancer Lett. 282, 1-8 (2009).



2. Yuan, Y., Padol, I. T. & Hunt, R. H. Peptic ulcer disease today. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 80-89 (2006).
3. Parkin, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer* 118, 3030-3044 (2006).
4. Peek, R. M. *Helicobacter pylori* infection and disease: from humans to animal models. *Dis Model Mech* 1, 50-55 (2008).
5. Barker, N. y otros, Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6, 25-36 (2010).
6. Longmire, T. A. y otros, Efficient Derivation of Purified Lung and Thyroid Progenitors from Embryonic Stem Cells. *Stem Cell* 10, 398-411 (2012).
7. Mou, H. y otros, Generation of Multipotent Lung and Airway Progenitors from Mouse ESCs and Patient-Specific Cystic Fibrosis iPSCs. *Stem Cell* 10, 385-397 (2012).
8. Si-Tayeb, K. y otros, Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 51, 297-305 (2010).
9. D'Amour, K. A. y otros, Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 24, 1392-1401 (2006).
10. Spence, J. R. y otros, Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* 470, 105-109 (2011).
11. D'Amour, K. A. y otros, Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23, 1534-1541 (2005).
12. McCracken, K. W., Howell, J. C., Spence, J. R. & Wells, J. M. Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells in vitro. *Nature Protocols* 6, 1920-1928 (2011).
13. Kumar, M., Jordan, N., Melton, D. & Grapin-Botton, A. Signals from lateral plate mesoderm instruct endoderm toward a pancreatic fate. *Dev Biol* 259, 109-122 (2003).
14. Tiso, N., Filippi, A., Pauls, S., Bortolussi, M. & Argenton, F. BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish. *Mech Dev* 118, 29-37 (2002).
15. Wang, Z., Dollé, P., Cardoso, W. V. & Niederreither, K. Retinoic acid regulates morphogenesis and patterning of posterior foregut derivatives. *Dev Biol* 297, 433-445 (2006).
16. Martín, M. y otros, Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient *Raldh2* mutant mice. *Dev Biol* 284, 399-411 (2005).
17. Molotkov, A., Molotkova, N. & Duyster, G. Retinoic acid generated by *Raldh2* in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development. *Dev Dyn* 232, 950-957 (2005).
18. Kawaguchi, Y. y otros, The role of the transcriptional regulator *Ptfla* in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 32, 128-134 (2002).
19. Johnson, L. R. & Guthrie, P. D. Stimulation of rat oxyntic gland mucosal growth by epidermal growth factor. *Am. J. Physiol.* 238, G45-9 (1980).
20. Majumdar, A. P. Postnatal undernutrition: effect of epidermal growth factor on growth and function of the gastrointestinal tract in rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 3, 618-625 (1984).
21. Spear, P. C. & Erickson, C. A. Interkinetic nuclear migration: A mysterious process in search of a function. *Develop. Growth Differ.* 54, 306-316 (2012).
22. Grosse, A. S. y otros, Cell dynamics in fetal intestinal epithelium: implications for intestinal growth and morphogenesis. *Development* 138, 4423-4432 (2011).
23. Verzi, M. P. y otros, Role of the homeodomain transcription factor *Bapx1* in mouse distal stomach development. *Gastroenterology* 136, 1701-1710 (2009).

24. Mills, J. C. & Shivasani, R. A. Gastric Epithelial Stem Cells. *Gastroenterology* 140, 412-424 (2011).
25. Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. & Guillemot, F. neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 1607-1611 (2000).
- 5 26. Jenny, M. y otros, Neurogenin3 is differentially required for endocrine cell fate specification in the intestinal and gastric epithelium. *EMBO J* 21, 6338-6347 (2002).
27. Johansson, K. A. y otros, Temporal control of neurogenin3 activity in pancreas progenitors reveals competence windows for the generation of different endocrine cell types. *Dev Cell* 12, 457-465 (2007).
- 10 28. López-Díaz, L. y otros, Intestinal Neurogenin 3 directs differentiation of a bipotential secretory progenitor to endocrine cell rather than goblet cell fate. *Dev Biol* 309, 298-305 (2007).
- 15 29. Schonhoff, S. E., Giel-Moloney, M. & Leiter, A. B. Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Dev Biol* 270, 443-454 (2004).
30. Lee, C. S., Perreault, N., Brestelli, J. E. & Kaestner, K. H. Neurogenin 3 is essential for the proper specification of gastric enteroendocrine cells and the maintenance of gastric epithelial cell identity. *Genes Dev* 16, 1488-1497 (2002).
- 20 31. O'Be, L., Hamlet, A., Dalenbäck, J. & Fändriks, L. A mechanism by which *Helicobacter pylori* infection of the antrum contributes to the development of duodenal ulcer. *Gastroenterology* 110, 1386-1394 (2001).
- 25 32. Xia, H. H. y otros, Antral-type mucosa in the gastric incisura, body, and fundus (antralization): a link between *Helicobacter pylori* infection and intestinal metaplasia? *Am. J. Gastroenterol.* 95, 114-121 (2000).
33. Churin, Y. y otros, *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *J. Cell Biol.* 161, 249-255 (2003).
- 30 34. Peek, R. M. y otros, *Helicobacter pylori* cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 863-868 (1997).
- 35 35. Teo, A. K. K. y otros, Activin and BMP4 Synergistically Promote Formation of Definitive Endoderm in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 30, 631-642 (2012).
36. Meerbrey, K. L. y otros, The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 3665-3670 (2011).
- 40 37. Okita, K. y otros, An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 31, 458-466 (2013).
38. Covacci, A. y otros, Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5791-5795 (1993).
- 45 39. Amieva, M. R., Salama, N. R., Tompkins, L. S. & Falkow, S. *Helicobacter pylori* enter and survive within multi-vesicular vacuoles of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 4, 677-690 (2002).
- 50 40. Schumacher, M. A. y otros, Gastric Sonic Hedgehog acts as a macrophage chemoattractant during the immune response to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 142, 1150-1159.e6 (2012).

## REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de generación de un organoide gástrico que comprende las etapas de:
  - a) generar un endodermo definitivo (DE) a partir de una célula madre pluripotente;
  - b) poner en contacto dicho endodermo definitivo con un activador de la vía de señalización FGF, un activador de la vía de señalización WNT, un inhibidor de BMP y ácido retinoico para generar un esferoide del intestino anterior posterior, en donde dicho activador de la vía de señalización FGF se selecciona del grupo que consiste en FGF1, FGF2, FGF3, FGF4, FGF10, FGF11, FGF12, FGF13, FGF14, FGF15, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF20, FGF21, FGF22, FGF23 y combinaciones de estos, y dicho activador de la vía de señalización WNT se selecciona del grupo Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, activador de molécula pequeña de la vía de señalización WNT y combinaciones de estos; y
    - c<sub>1</sub>) poner en contacto dicho esferoide del intestino anterior posterior con EGF, ácido retinoico y un inhibidor de BMP, para generar un tejido del antro; o
    - c<sub>2</sub>) poner en contacto dicho esferoide del intestino anterior posterior con EGF, ácido retinoico, un activador de la vía de señalización WNT y un inhibidor de BMP, para generar un tejido del fondo, en donde dicho activador de la vía de señalización WNT se selecciona del grupo de activadores de la vía de señalización WNT como se define en la etapa b).
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho endodermo definitivo se deriva de una célula madre pluripotente seleccionada de una célula madre embrionaria, una célula madre adulta y una célula madre pluripotente inducida.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho endodermo definitivo se deriva de poner en contacto una célula madre pluripotente con una o más moléculas seleccionadas de Activina, los subgrupos de BMP de la superfamilia de factores de crecimiento TGF-beta; Nodal, Activina A, Activina B, BMP4, Wnt3a y combinaciones de estos.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho activador de molécula pequeña de la vía de señalización WNT se selecciona del grupo que consiste en: Cloruro de litio; (hetero) arilpirimidinas con pirimidina 2-amino-4,6-disustituida; IQ1; QS11; Beta-catenina DCA; 2-amino-4-[3,4-(metilendioxi)-bencil-amino]-6-(3-metoxifenil) pirimidina; CHIR99021; WAY-316606; SB-216763 y BIO(6-bromoindirrubin-3'-oxima).
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho inhibidor de BMP se selecciona de Noggin, Dorsomorfin, LDN189, DMH-1 y combinaciones de estos.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho activador de la vía de señalización FGF es FGF4.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la etapa b) comprende poner en contacto dicho endodermo con FGF4 a una concentración entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1500 ng/ml.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho activador de la vía de señalización WNT es Wnt3a.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la etapa b) comprende poner en contacto dicho endodermo con Wnt3a a una concentración entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1500 ng/ml.
10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la etapa b) comprende poner en contacto dicho endodermo con un inhibidor de BMP a una concentración entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1500 ng/ml.
11. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la etapa b) comprende poner en contacto el endodermo con el activador de la vía de señalización FGF, el activador de la vía de señalización WNT y el inhibidor de BMP antes de ponerlo en contacto con ácido retinoico.
12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la etapa b) comprende poner en contacto dicho endodermo con Wnt3a o CHIR99021, un inhibidor de BMP y FGF4, antes de ponerlo en contacto con ácido retinoico.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el ácido retinoico de la etapa b) se administra en una cantidad de entre aproximadamente 0,2 uM y aproximadamente 20 uM.
14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde la etapa b) se lleva a cabo hasta que se detecta la expresión de Pdx1/Sox1 en dichos esferoides del intestino anterior.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dicha exposición a EGF en la etapa c<sub>1</sub> o c<sub>2</sub> es a una concentración y un período de tiempo suficientes para aumentar dichos esferoides gástricos a más de 1 mm de diámetro, o más de 2 mm de diámetro, o más de 3 mm de diámetro, o más de 4 mm de diámetro.

5

Figura 1

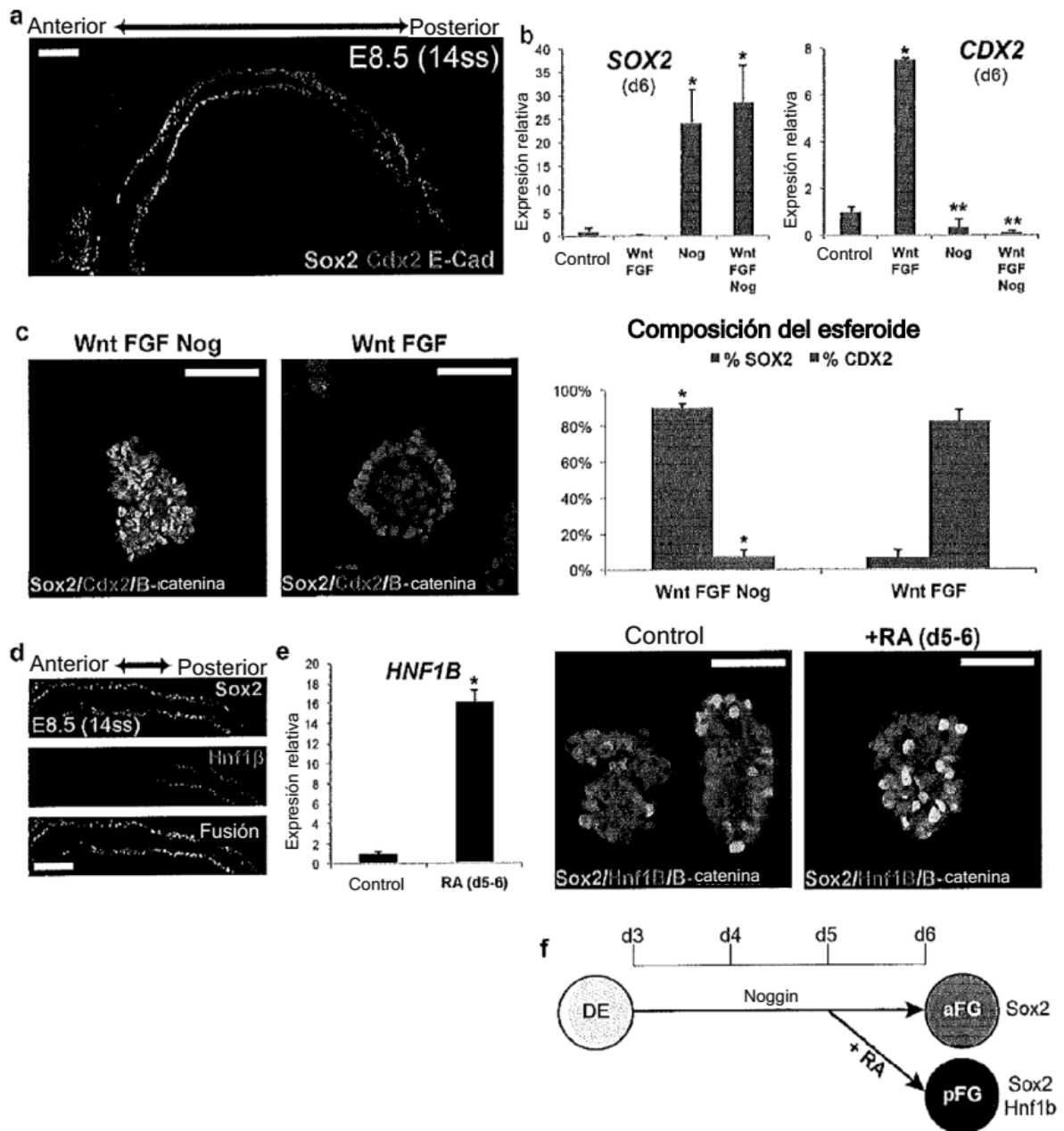


Figura 2

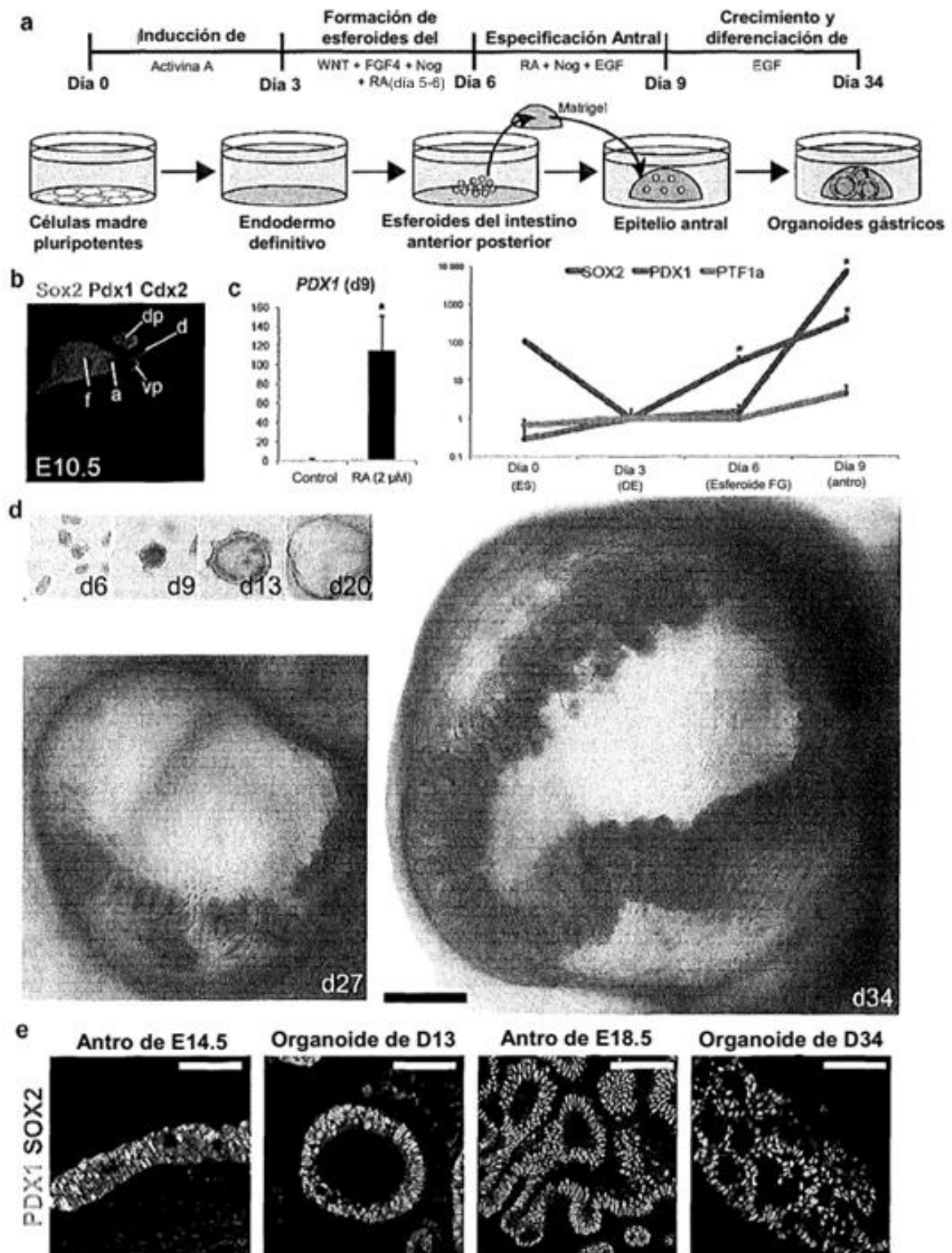


Figura 3

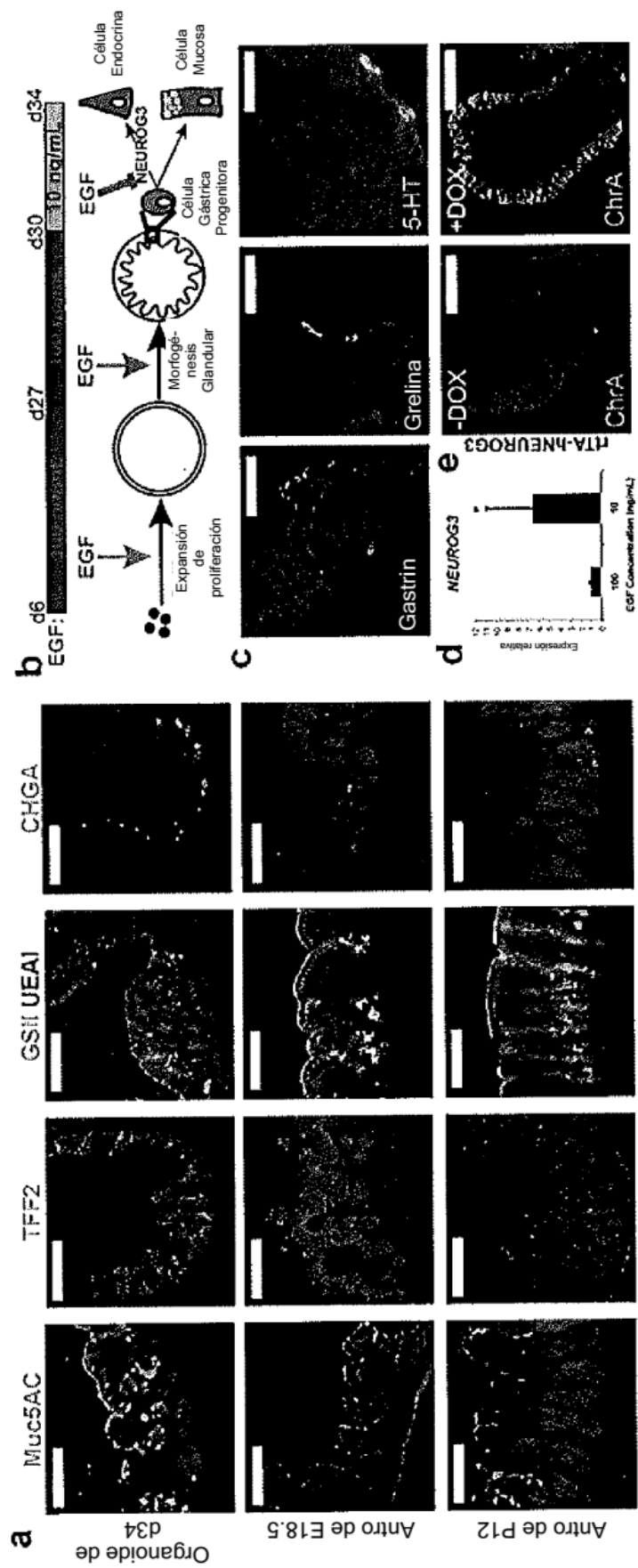


Figura 4

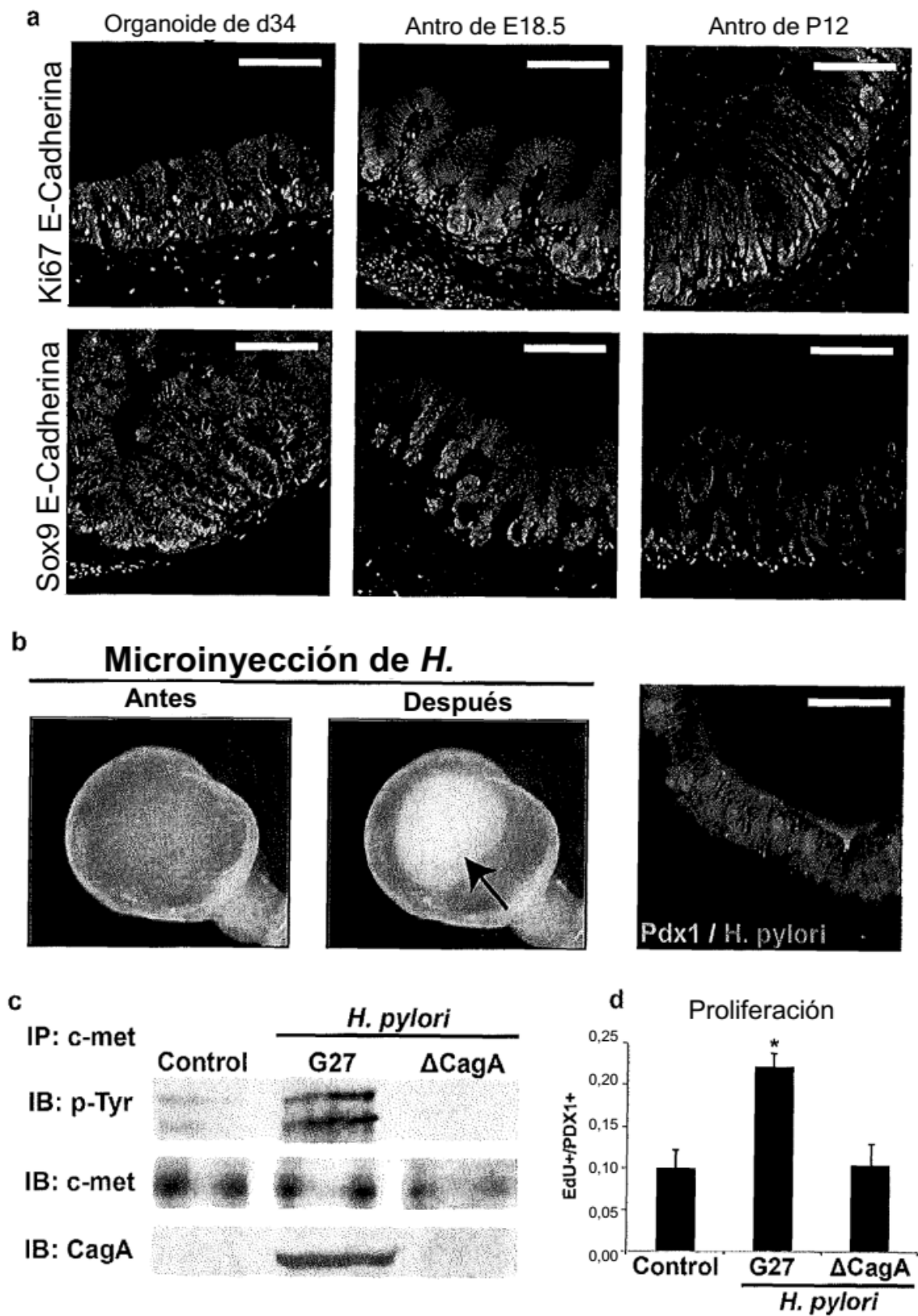
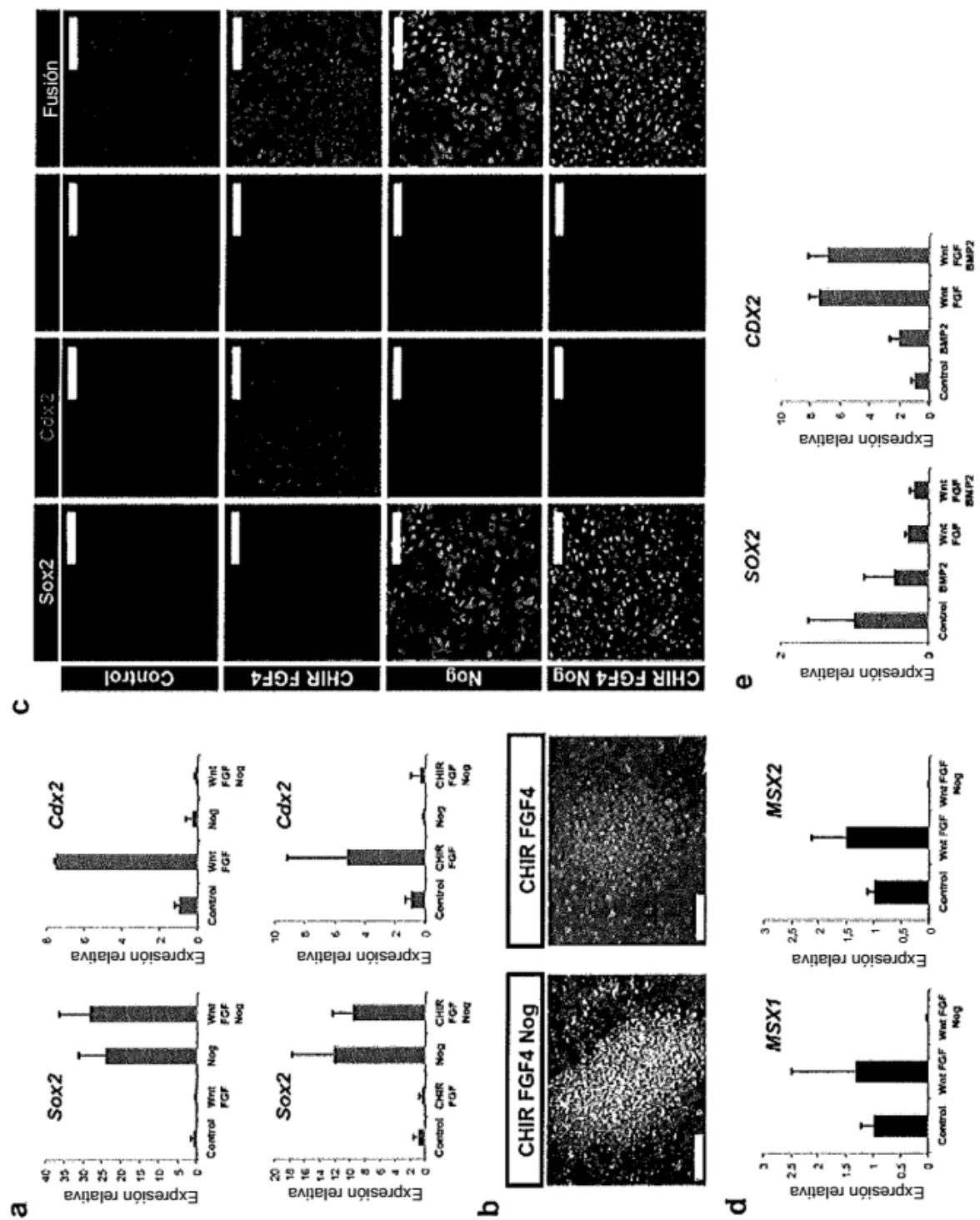




Figura 5



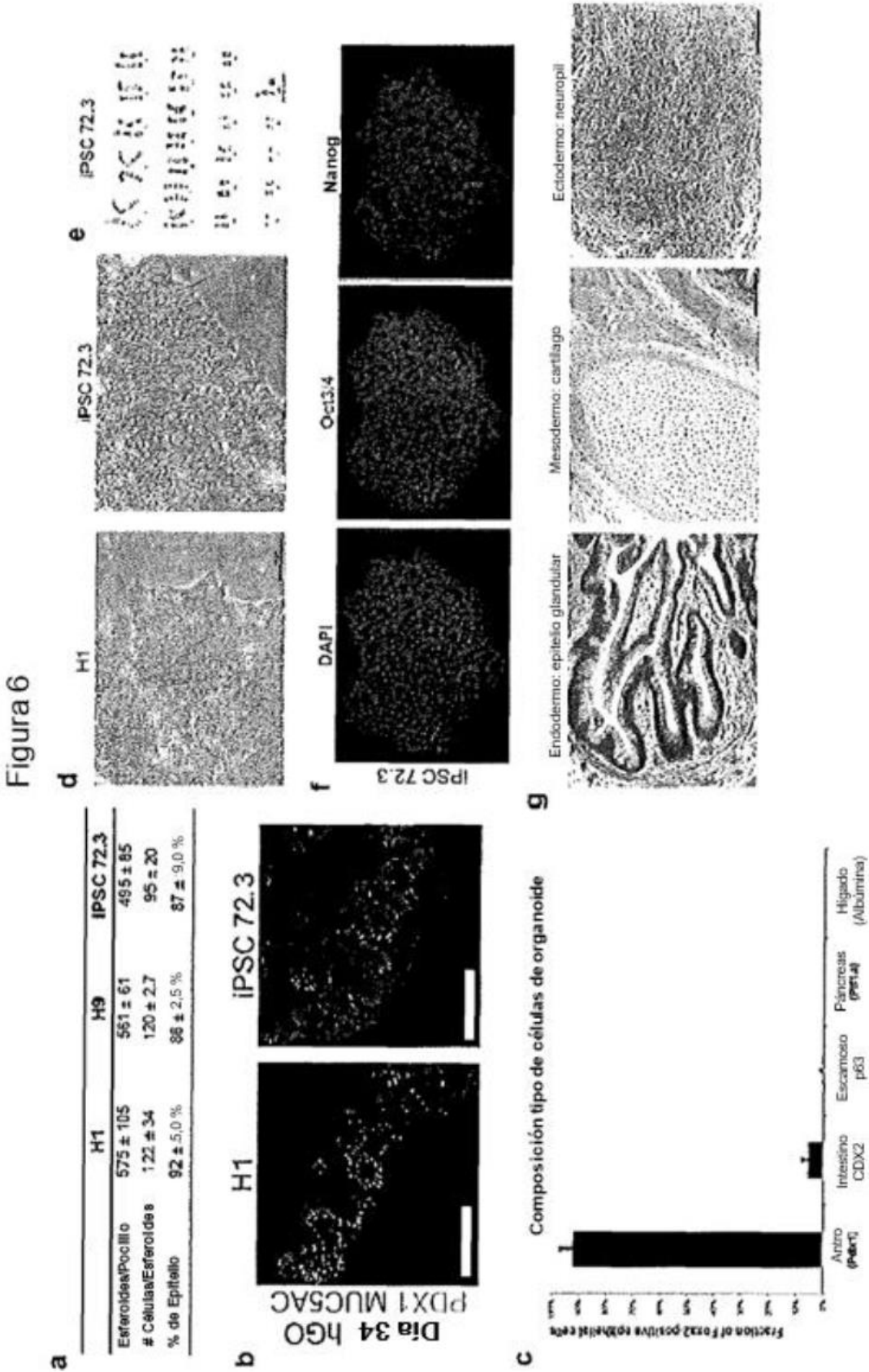


Figura 7

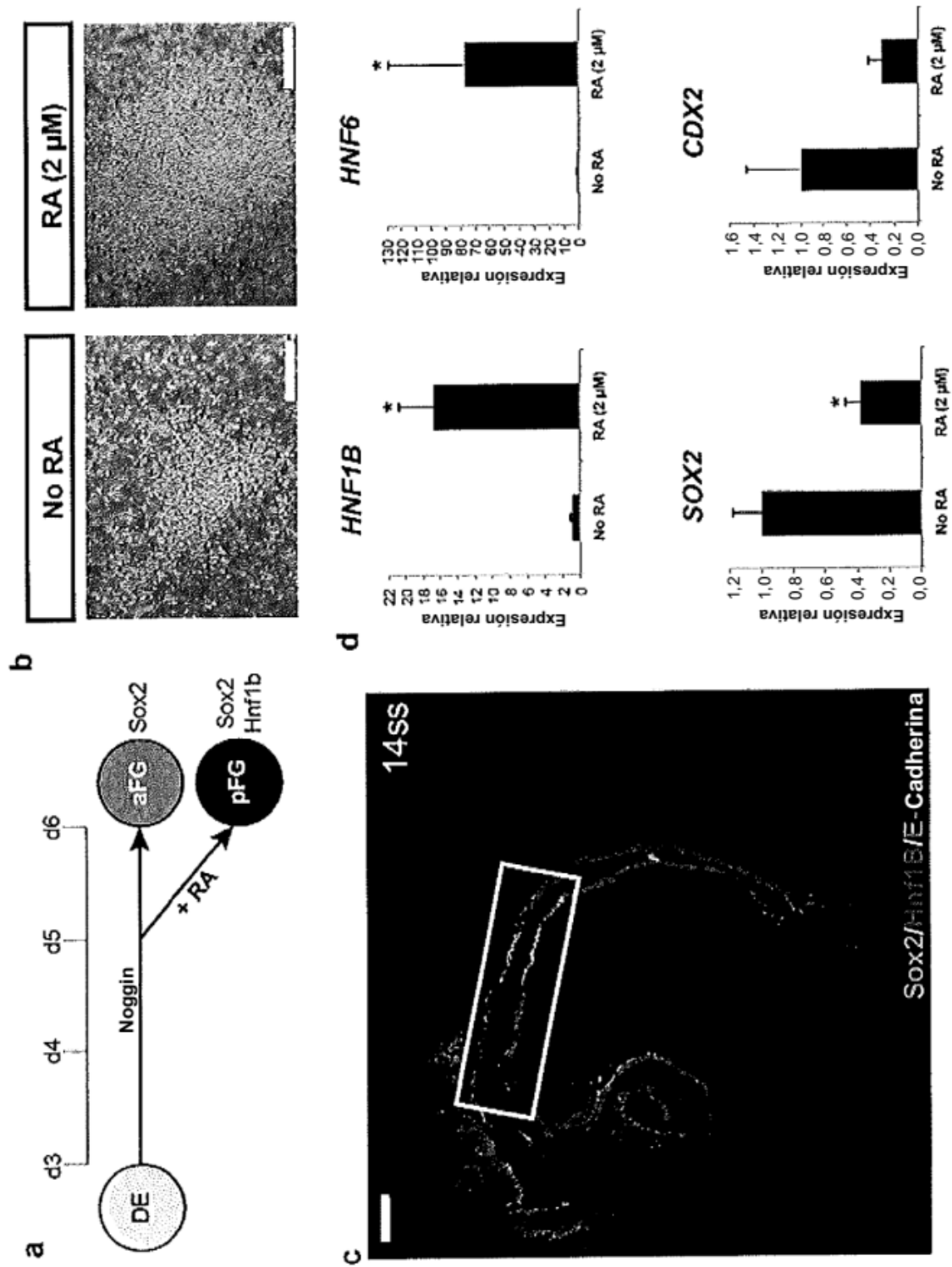


Figura 8

Organoides gástricos Día 34

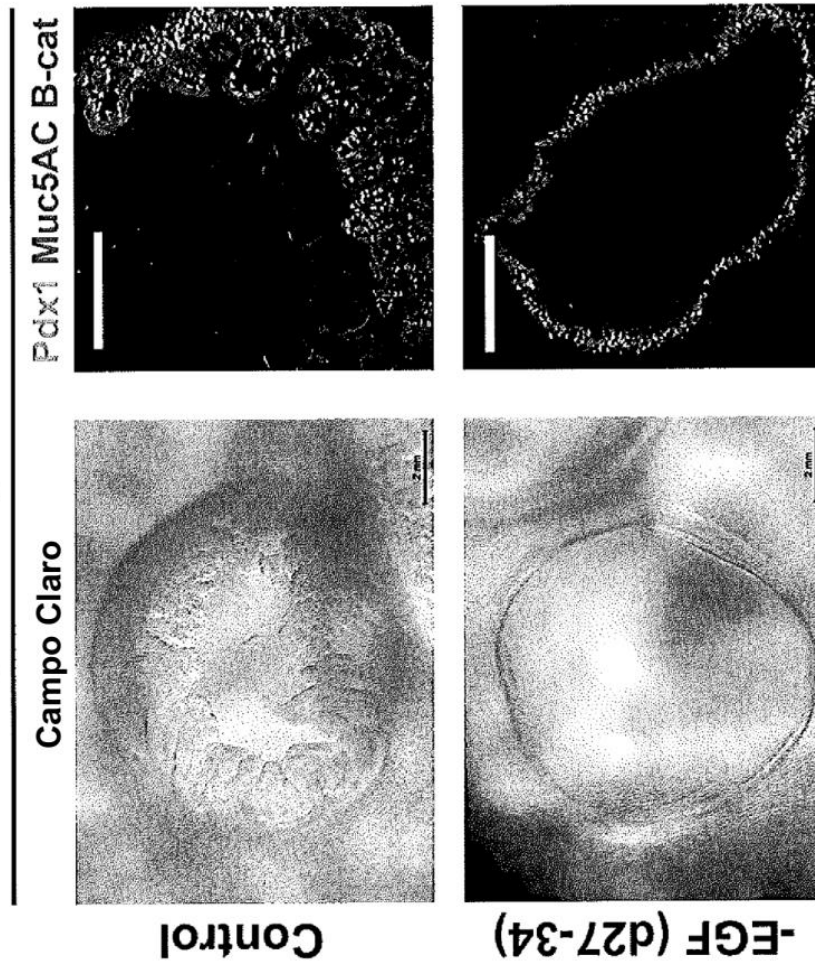


Figura 9

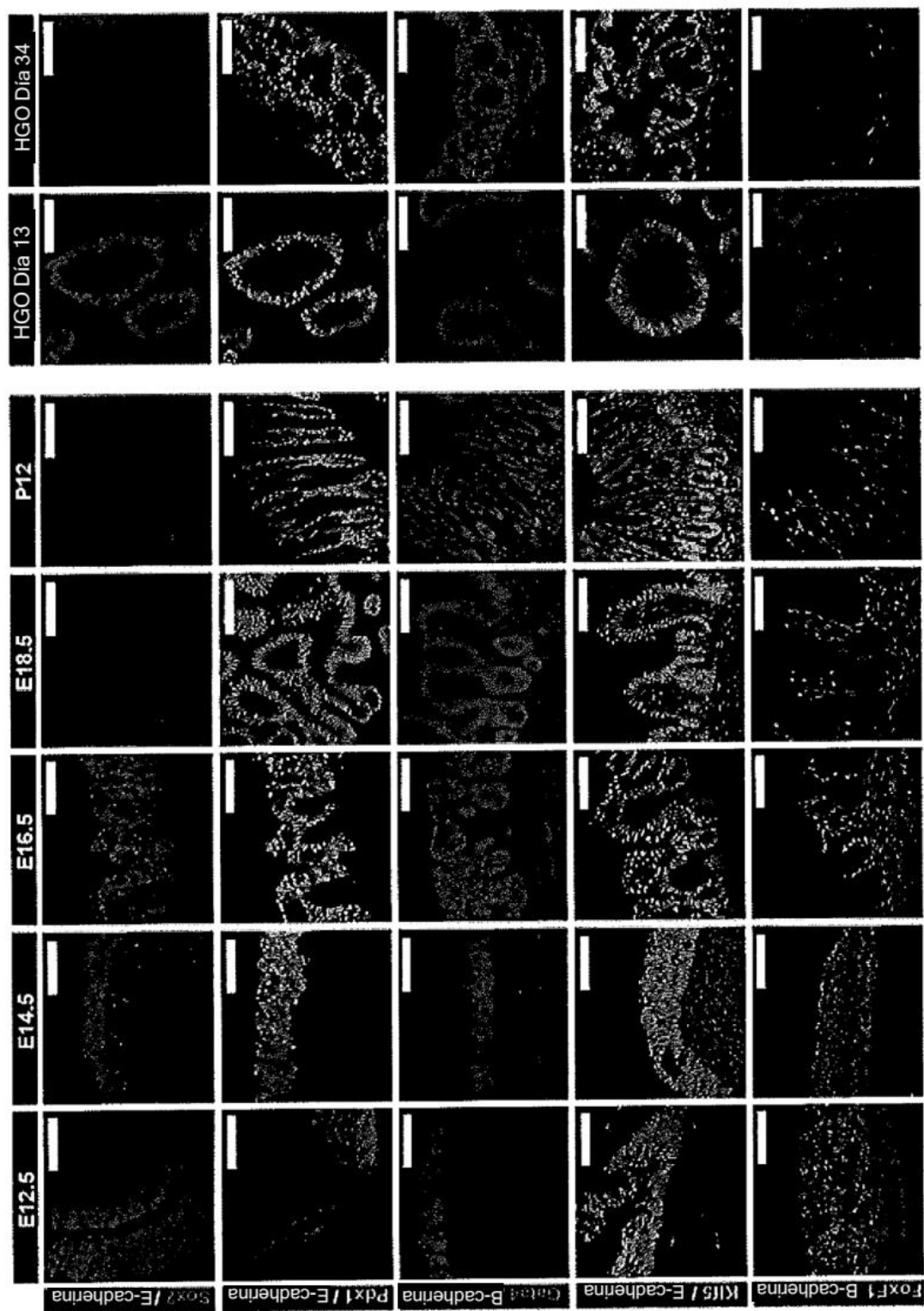


Figura 10

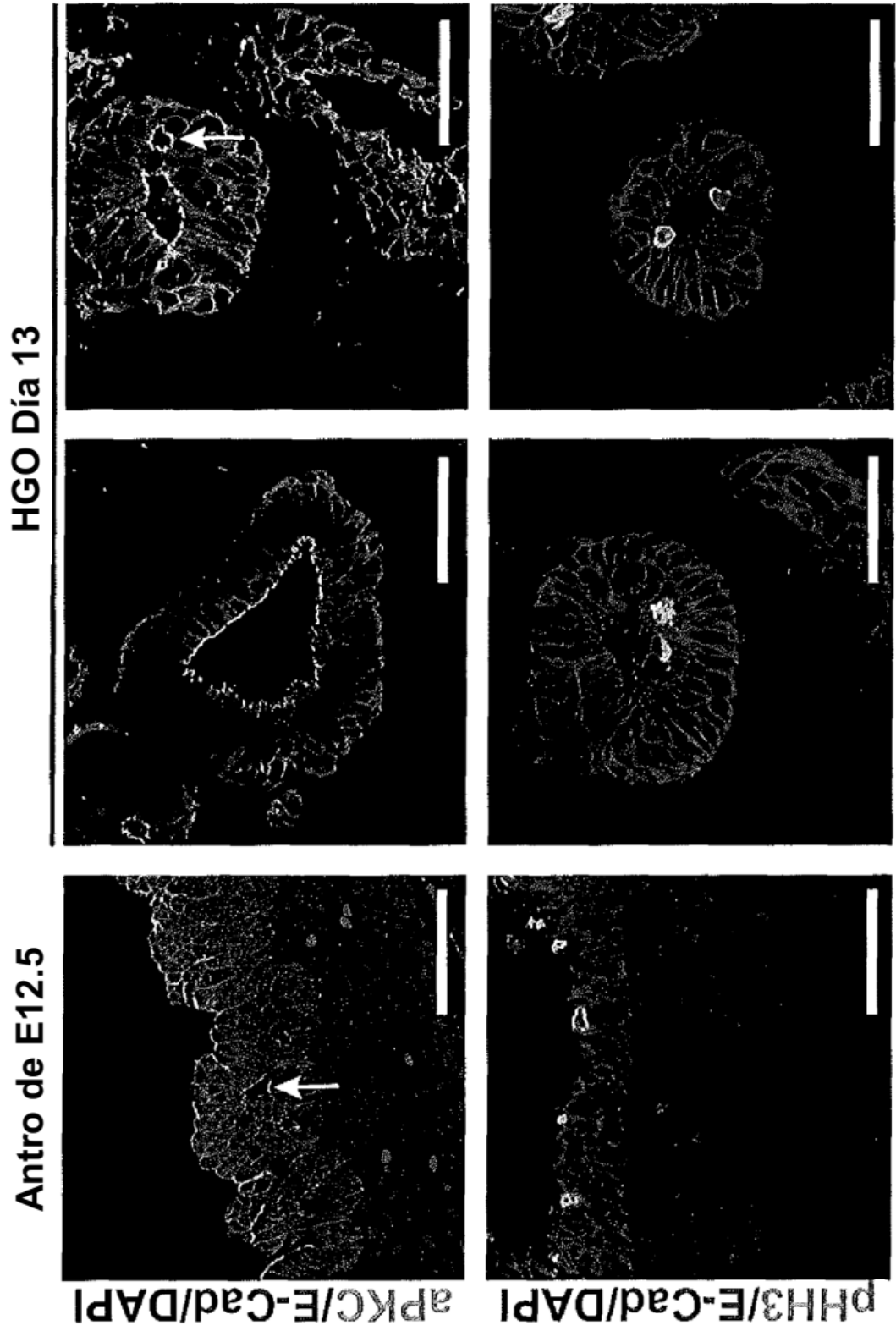


Figura 11

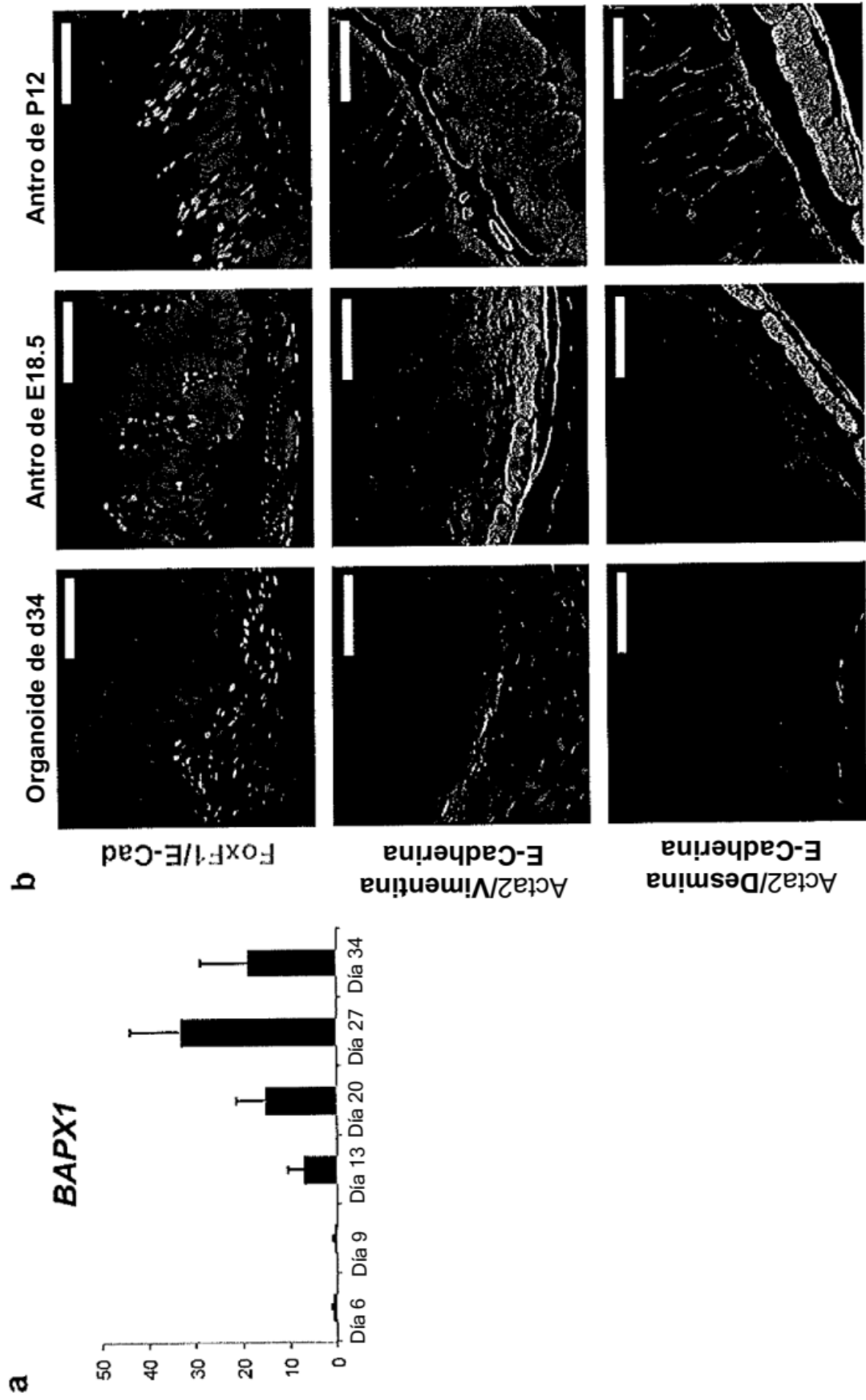


Figura 12

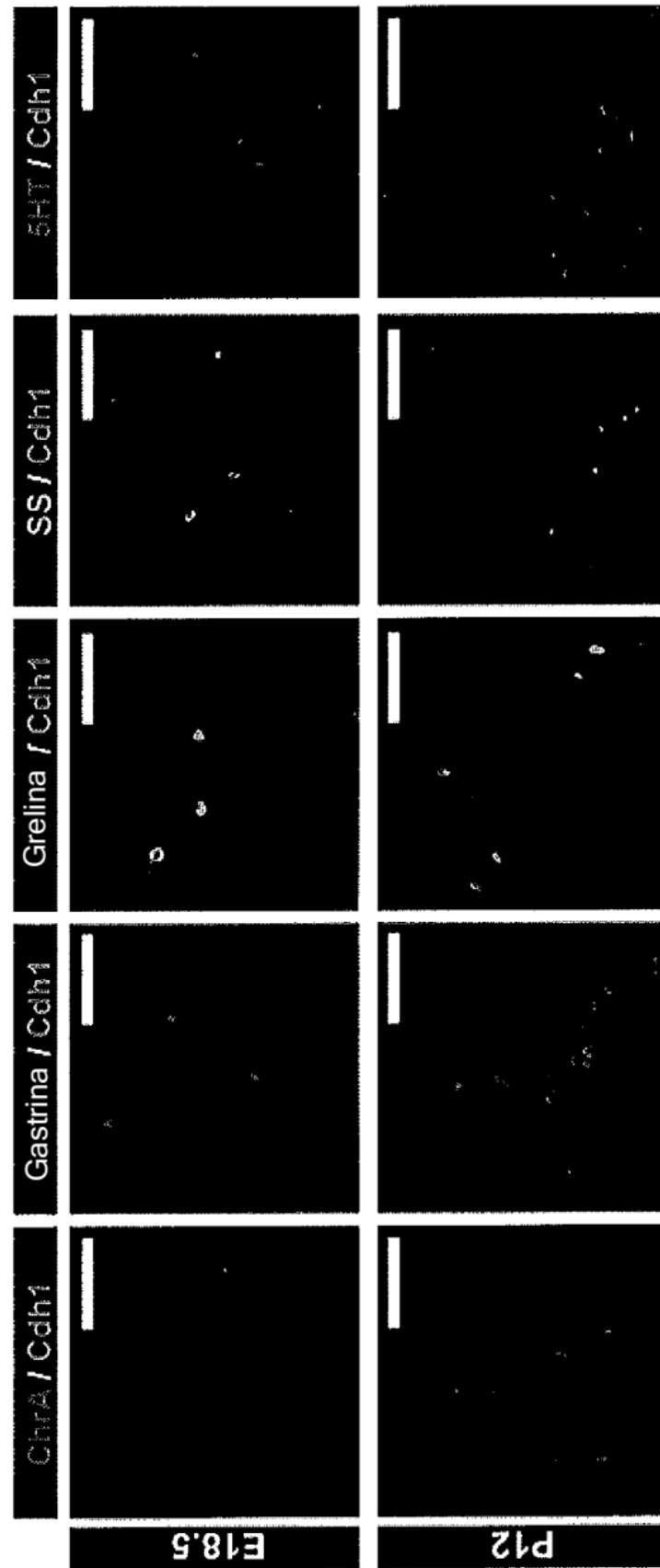




Figura 13

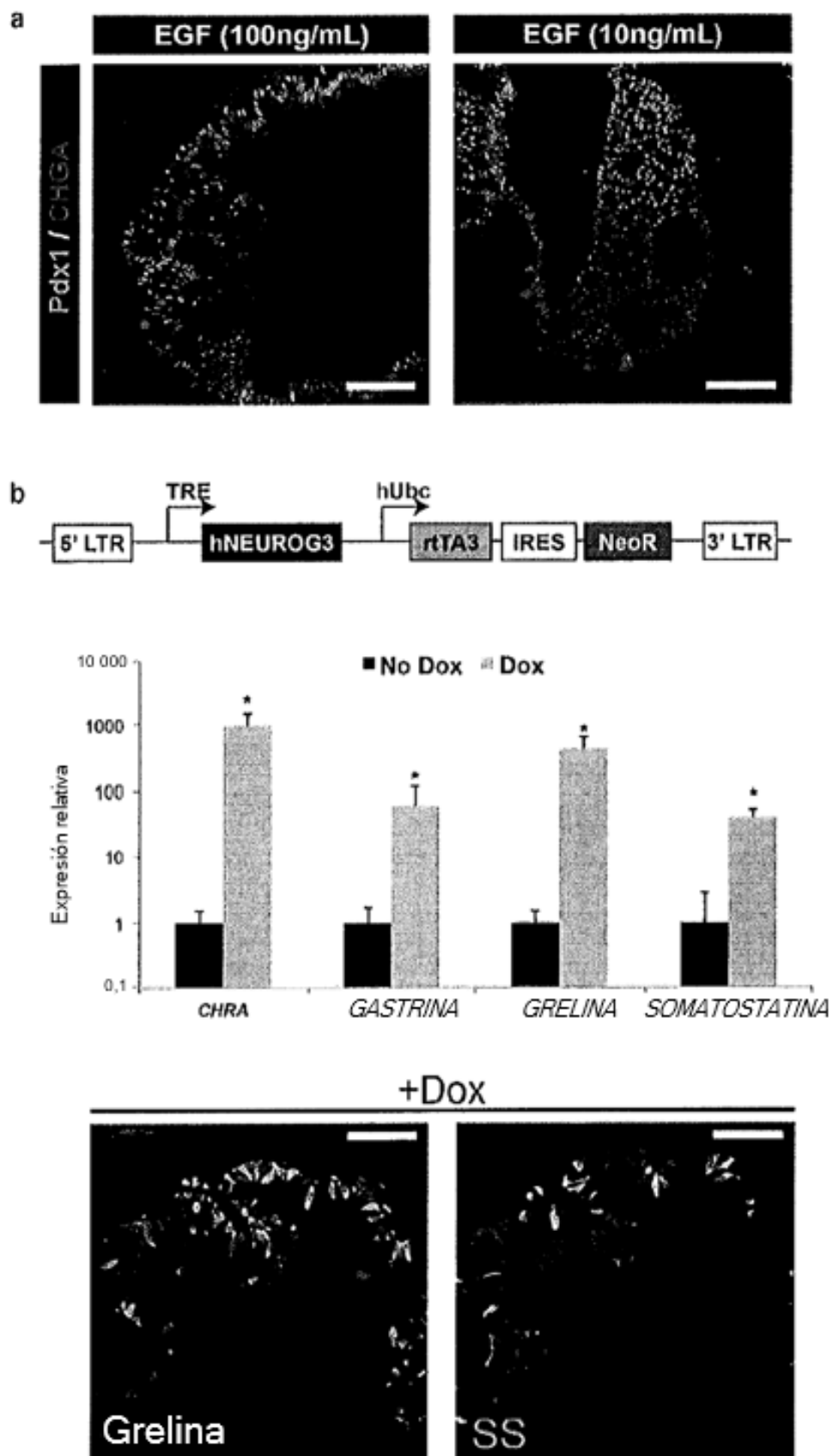


Figura 14

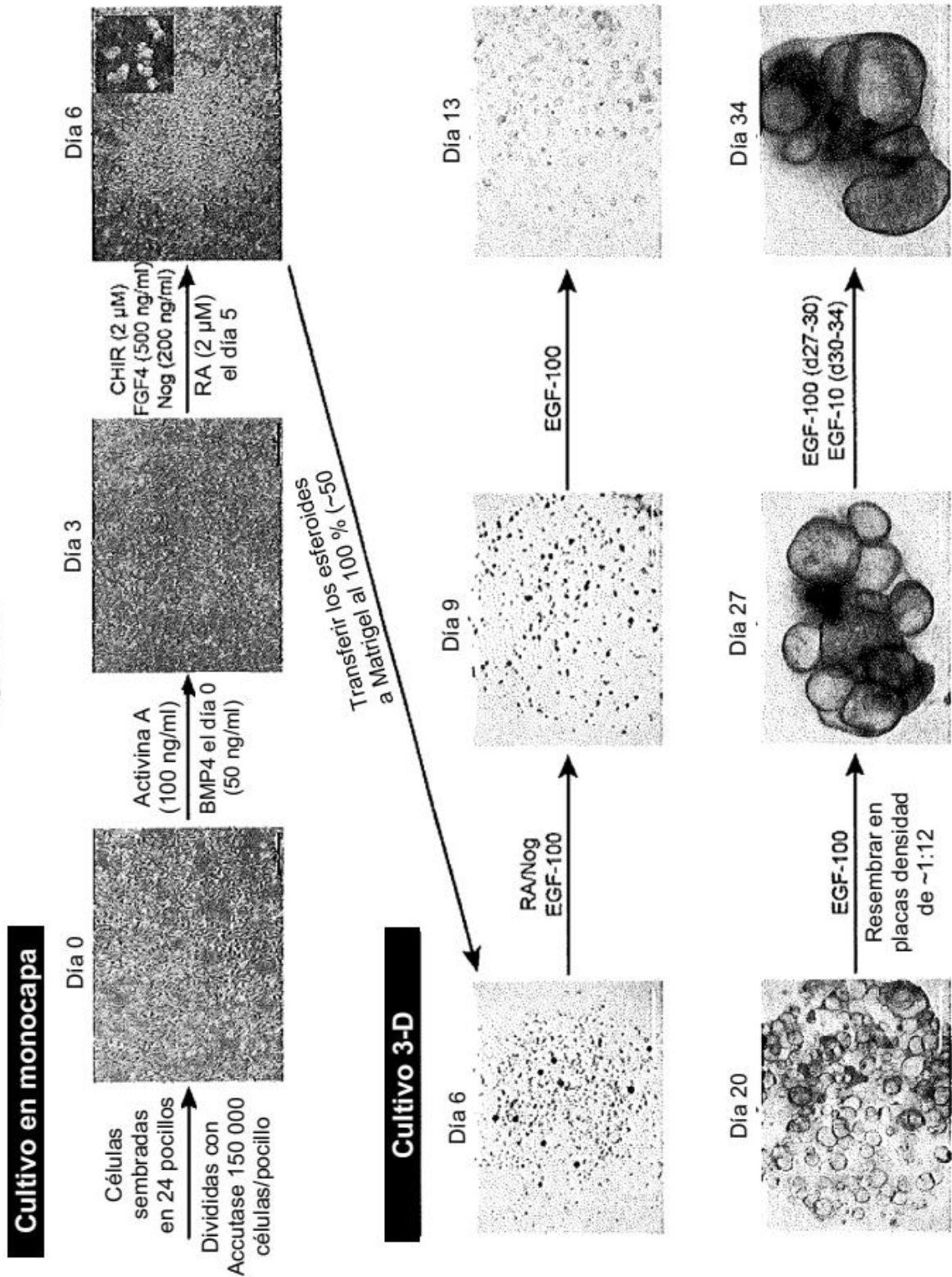
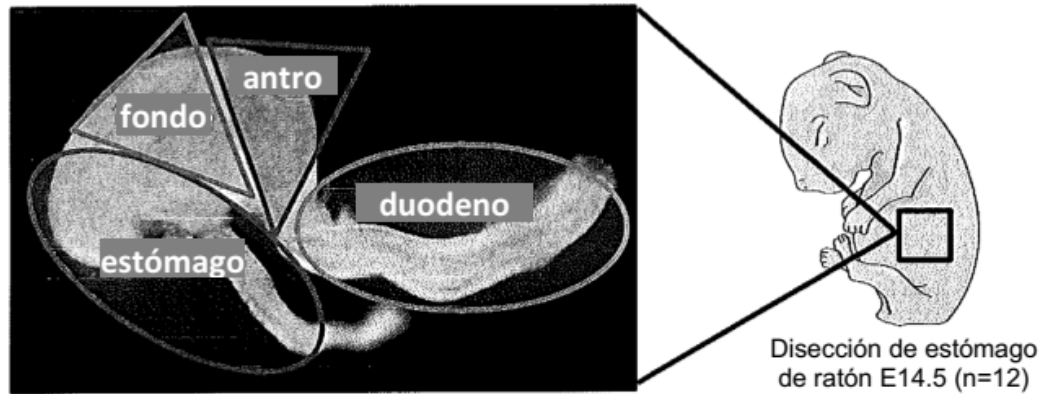


Figura 15

# **1. Marcador de fondo - Investigación en regiones del estómago de ratón E14.5**

## **Procedimiento experimental**



## **Marcadores regionales conocidos**

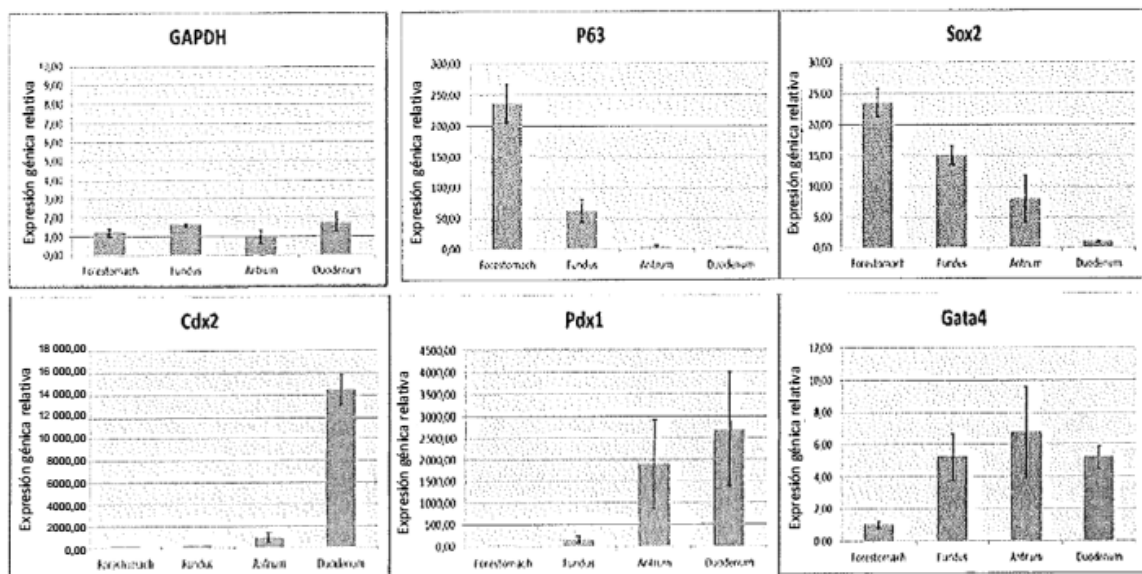
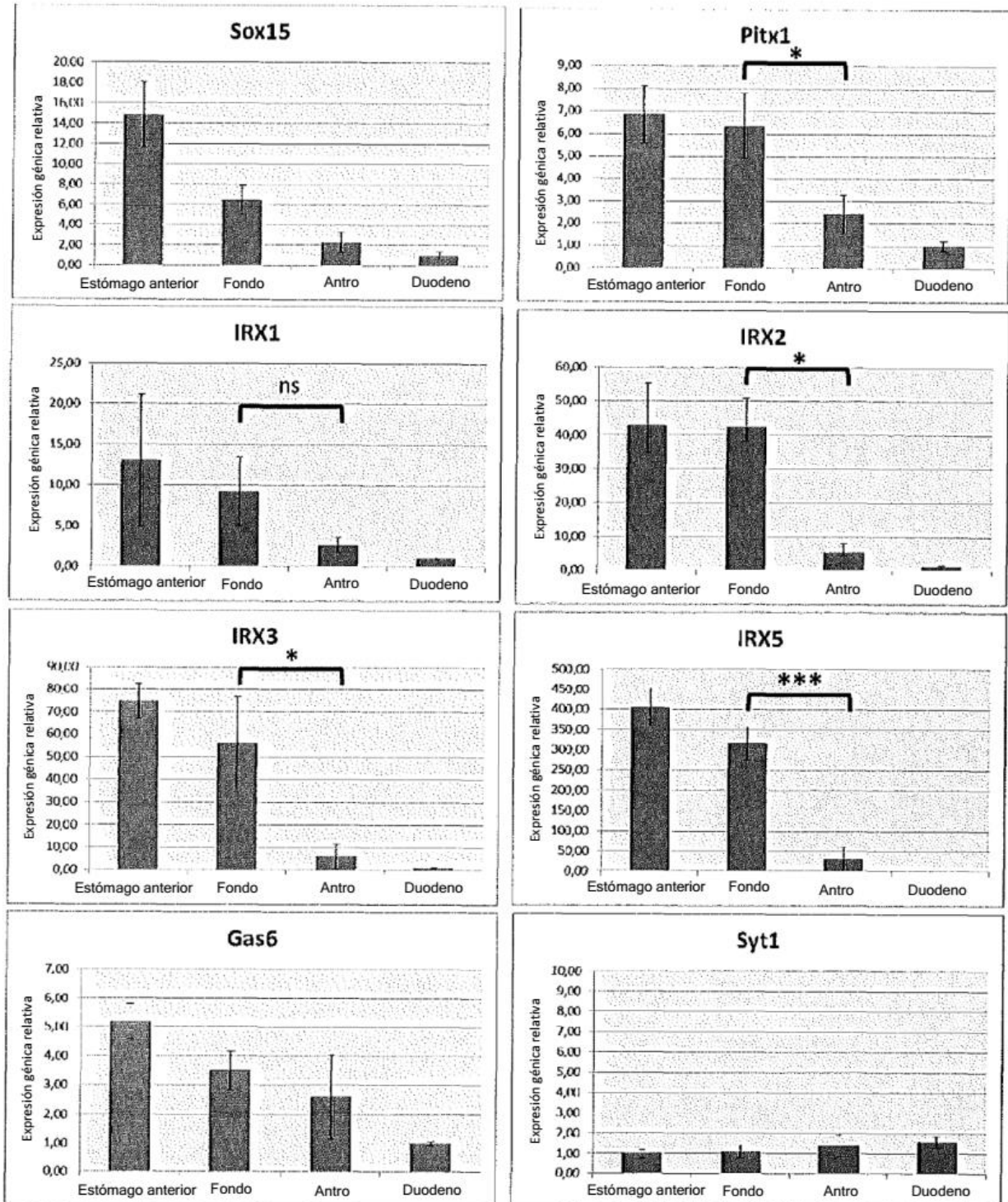


Figura 16

### Nuevos marcadores regionales



Prueba t:  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,001$  \*\*\*

Figura 17

**Protocolo de especificación de fondo**

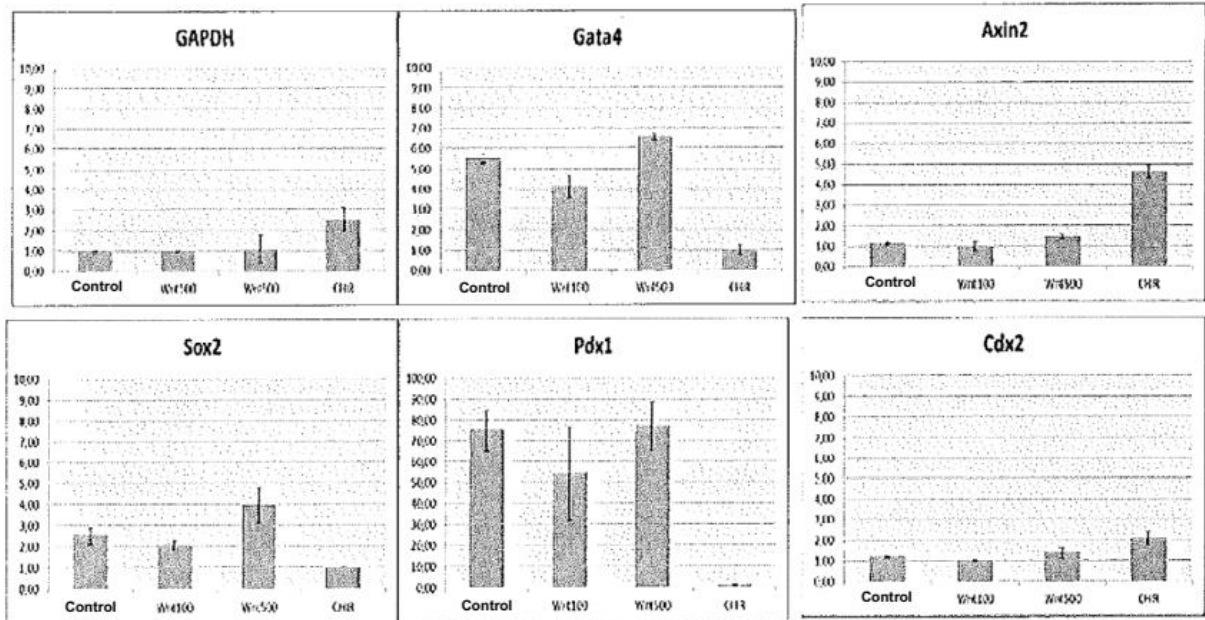
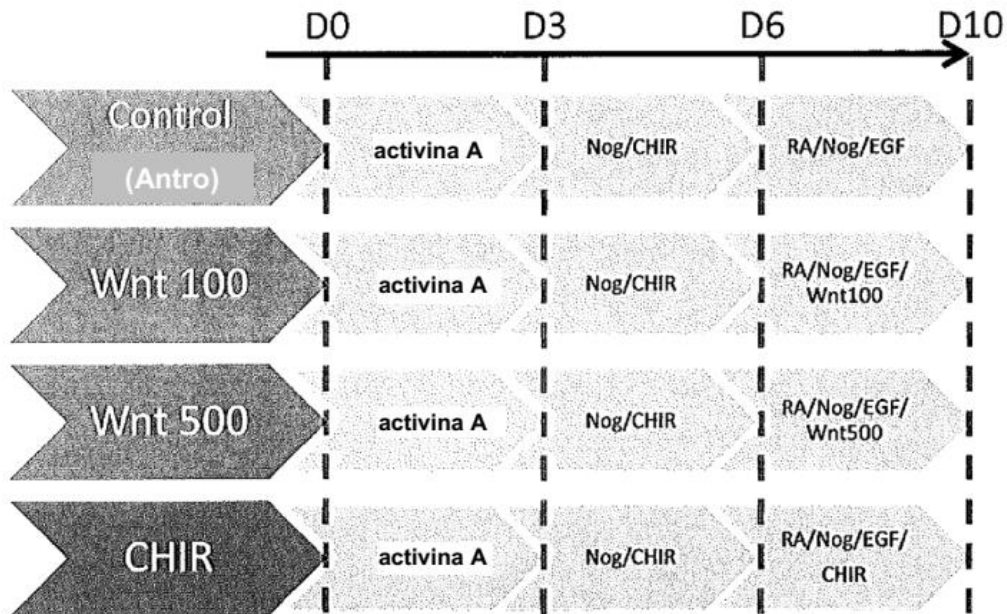


Figura 18

**2. Especificación de fondo - influencia de la vía Wtn**

**Resultados - Protocolo 2**

